



UFAM



PPGIBA

Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

FELIPE RODOLFO PEREIRA DA SILVA

**DETERMINANTES GENÉTICAS EM GENES DE INTERLEUCINAS E SUAS
POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES COM O RISCO NO DESENVOLVIMENTO DE
PERIODONTITE: RESULTADOS DE METANÁLISES CONVENCIONAIS E COM
ABORDAGEM BAYESIANA**

Manaus

2020

FELIPE RODOLFO PEREIRA DA SILVA

**DETERMINANTES GENÉTICAS EM GENES DE INTERLEUCINAS E SUAS
POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES COM O RISCO NO DESENVOLVIMENTO DE
PERIODONTITE: RESULTADOS DE METANÁLISES CONVENCIONAIS E COM
ABORDAGEM BAYESIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do
Amazonas como requisito para obtenção do título de
Doutor em Imunologia.

Área de concentração: Imunogenética e epidemiologia
molecular das doenças infecciosas

Orientador (a): Prof. Dr. José Fernando Marques
Barcellos

Co-orientadora: Profa. Dra. Sylvania da Conceição Furtado

Manaus

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586d Silva, Felipe Rodolfo Pereira da
Determinantes genéticas em genes de interleucinas e suas possíveis associações com o risco no desenvolvimento de periodontite: resultados de metanálises convencionais e com abordagem bayesiana / Felipe Rodolfo Pereira da Silva . 2020
135 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Fernando Marques Barcellos
Coorientadora: Silvânia da Conceição Furtado
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Citocinas. 2. Doença periodontal. 3. Alelos. 4. Odds Ratio. 5. Variação genética. I. Barcellos, José Fernando Marques. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

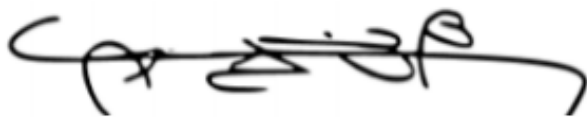
**DETERMINANTES GENÉTICAS EM GENES DE INTERLEUCINAS E SUAS
POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES COM O RISCO NO DESENVOLVIMENTO DE
PERIODONTITE: RESULTADOS DE METANÁLISES CONVENCIONAIS E COM
ABORDAGEM BAYESIANA**

FELIPE RODOLFO PEREIRA DA SILVA

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora composta por:



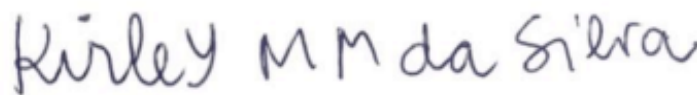
Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos (presidente)



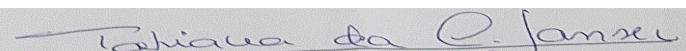
Prof. Dr. Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes (membro interno)



Prof. Dr. Marcelo Diniz Carvalho (membro externo à instituição)



Profa. Dra. Kirley Michelly Marques da Silva (membro externo ao programa)



Profa Dra. Tatiana da Costa Jansen (membro externo à instituição)

Manaus, junho de 2020

“Tudo o que está no plano da realidade já foi sonho um dia.”

Leonardo da Vinci

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à Deus que permitiu que os caminhos se alinhassem da melhor forma na construção do sonho que vem sendo realizado. Dedico também à minha família e amigos que ficaram na Paraíba e no Piauí, mas que carrego no meu coração e penso neles todos os dias! Por último, dedico este trabalho à Ciência, ao amor pelo conhecimento, à vontade de fazer a diferença, à resistência humana que pensamos não ter mas que aparece nos momentos apropriados; também dedico aos cálculos estatísticos cada vez mais inovadores e por fim à metanálise.

AGRADECIMENTOS

Meu sincero obrigado:

À minha família, pelo amor, pelo apoio e pelos ensinamentos que me foram passados a cada chegada do meu pai (*in memoriam*) e meus irmãos em casa sujos de cimento e areia após um exaustivo dia de trabalho, mas que nunca os fez perder a força.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos, e a minha Co-orientadora, Profa. Dra. Silvania da Conceição Furtado por terem aberto as portas e me recebido com toda animação e apoio quando cheguei até eles falando sobre metanálise e periodontite. Agradeço também a confiança, a amizade e a liberdade na condução deste trabalho!

À equipe da coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, nas pessoas de sua Coordenadora, Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria e equipe administrativa composta por Ana Paula e Edson Brandão. Agradeço a sempre responsabilidade, atendimento eficaz e compromisso com a funcionalidade do programa!

Aos membros da Banca de defesa de Tese em seu presidente Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos, nos membros Prof. Dr. Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes, Prof. Dr. Marcelo Diniz Carvalho, Profa. Dra. Prof. Dra. Tatiana da Costa Jansen e Profa. Dra. Kirley Michelly Marques da Silva. Agradeço por aceitarem o convite de participação nesta banca bem como pelo profissionalismo e rigor científico que trarão importantes contribuições ao trabalho.

Às amigas Larissa dos Santos Pessoa e Juliana Gomes Galeno pela amizade, por mesmo longe e com cotidianos corridos sempre estão dispostas a ajudar com uma palavra de conforto ou com a colaboração efetiva nos trabalhos! Meu coração está com vocês!

À minha colega de doutorado e amiga Nayanna Yared Batista pelos risos, pela sempre acolhida no laboratório de farmacologia, pela careta toda vez que bebia meus cafés fortes (risos), por todas as vezes que ficava ruborizada quando eu falava alguma cretinice (risos), pelas orientações como colega de profissão e pela amizade sincera;

Ao meu ex-orientador, Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, por ter dado o “start” de abertura no contato com os coreanos e assim tornado possível a parceria que resultou na construção das recentes metanálises;

Ao Reyce Santos Koga (meu Reycezinho), pelo carinho, por todos os rodízios que fomos conhecer, pelas conversas e palavras de conforto bem como pela amizade simples, generosa e verdadeira que desenvolvemos;

Ao Alessandro Luiz Araújo Bentes Leal, pelo amor e apoio, pela amizade, por todo o companheirismo, por ter aceitado entrar no meu mundo, por ter se tornado um homem essencial na minha vida e por ter me trago nossos lindos filhos, Sabrina, Nicholas, Maurício e Zara!

Ao menino com cabeça de cientista que chegou à Manaus em Março de 2017 e que foi surpreendido com mudanças profundas, que teve sonhos desconstruídos, mas que felizmente pôde se reinventar e se aperfeiçoar. Hoje ele está aqui apresentando este trabalho!

RESUMO

A periodontite é uma doença inflamatória que possui elevada prevalência na clínica odontológica o qual sua fisiopatologia é marcada pela atuação de mediadores inflamatórios que culminam com a degradação dos tecidos de suporte dental. Variações genéticas em genes de interleucinas (IL) recebem considerável atenção no contexto de fatores relacionados ao maior risco de desenvolvimento da periodontite. Tanto estudos caso/controle em polimorfismos em genes de citocinas como a IL-2 ou de moléculas participantes dos mecanismos epigenéticos como o RNA não codificador antisense INK4 (ANRIL) ou estudos de metanálises sobre variantes gênicas na IL1A, 1B, 1RN, 4, 6, dentre outras que buscam determinar a associação com a periodontite. Contudo, resultados contraditórios sobre a associação entre polimorfismos nos genes IL2 e ANRIL estão disponíveis na literatura bem como a possibilidade de achados falso-positivos nas metanálises acerca de polimorfismos em genes de IL e o risco de periodontite. Assim, visto tais achados, este estudo objetiva realizar metanálises sobre variações genéticas no IL2 e ANRIL e revalidar os achados de metanálises sobre polimorfismos em genes de IL e periodontite crônica por meio de abordagem Bayesiana. Para isso uma busca sistemática em bases de dados específicas foi realizada para estudos publicados anteriormente a 2019 seguindo critérios de inclusão para os estudos. Os dados foram extraídos dos artigos inclusos com posterior avaliação estatística por meio dos softwares *Review Manager* e *Comprehensive Meta-analysis* com cálculos de heterogeneidade (I^2), *Odds Ratio* (OR) e os testes de viés de publicação com auxílio do gráfico de *Funnel-plot*. Para todas as avaliações, o valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Na abordagem Bayesiana os cálculos da taxa de probabilidade falso-positivo (FPRP) e a probabilidade Bayesiana de descoberta falsa (BDFP) foram realizados para detectar a notoriedade dos achados das metanálises disponíveis na literatura com valor de $P < 0,02$ para FPRP e $P < 0,08$ para BDFP. Como resultados foram encontrados cinco estudos para o polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e periodontite crônica, 12 estudos para o polimorfismo rs1333048 no gene ANRIL e periodontite e 9 estudos de metanálise sobre diferentes polimorfismos em genes de interleucinas. Não houve associação significativa para o polimorfismo no gene IL2 e o risco de periodontite (OR=2,07, $P=0,15$) mas uma associação significativa entre o polimorfismo no gene ANRIL e o risco da doença (OR=1,24, $P < 0,00001$). Dentre todas as variantes genéticas apresentadas nas metanálises submetidas à abordagem Bayesiana, somente os polimorfismos rs1800587 na IL1A e rs1143634 no gene IL1B foram “dignos de nota”. Em conclusão este trabalho evidenciou a relação entre os polimorfismos nos genes IL2 e ANRIL com a periodontite, bem como a revalidação dos dados sobre metanálises focando nos polimorfismos nos genes IL1A e 1B com o risco de desenvolvimento de periodontite demonstrando essas variações como biomarcadores de susceptibilidade para a doença.

Palavras chave: Citocinas, Doença periodontal, Alelos, Odds Ratio, Variação Genética.

ABSTRACT

Periodontitis is an inflammatory disease with a high prevalence in dentistry, which its pathophysiology is characterized by the role of inflammatory mediators that culminates in a degradation of the support tissues around the teeth. Genetic variations in interleukin (IL) genes receive attention in the context of factors related with the increased risk of periodontitis developing. Both case studies / control of polymorphisms in cytokine genes such as IL-2 or molecules participating in epigenetic mechanisms such as the INK4 antisense non-coding RNA (ANRIL) or meta-analysis studies on IL1A, 1B, 1RN, 4, 6 genetic variants among other that determine the association with periodontitis. However, contradictory results on the association between polymorphisms in the IL2 and ANRIL genes are available in the literature, as well as the likelihood of false-positive findings in the analyses on polymorphisms in the IL genes and risk of periodontitis. Thus, in view of these findings, the aim of this study is to perform meta-analyses on genetic data on IL2 and ANRIL and validates the findings on polymorphisms in IL genes and chronic periodontitis through the Bayesian approach. For this, a systematic search of databases was carried out for studies previously published in 2019 following the inclusion of studies. Data were extracted from included articles with subsequent statistical assessment using the Review Manager and Comprehensive Meta-Analysis software with heterogeneity calculations (I^2), Odds Ratio (OR) and the publication bias tests with Funnel-plot graphic. In all evaluations, the value of $P < 0.05$ was considered as significant. In the Bayesian approach, calculations of False Positive Rate Probability (FPRP) and Bayesian False Discovery Probability (BFDP) were performed to detect the noteworthiness of the findings from the meta-analyzes available in the literature with a value of $P < 0.02$ for FPRP and $P < 0.08$ for BDFP. As results, five studies were found for the -330 T/G polymorphism in the IL2 gene and chronic periodontitis, 12 studies for the rs1333048 polymorphism in the ANRIL gene and periodontitis and 9 meta-analysis studies on different polymorphisms in the IL genes. There was no significant association for the polymorphism in the IL2 gene and the risk of periodontitis (OR = 2.07, $P = 0.15$), but a significant association between the polymorphism in the ANRIL gene and the risk of disease (OR = 1.24, $P < 0.00001$). All the genetic variants used in the analyses submitted to the Bayesian approach, including the polymorphisms rs1800587 in IL1A and rs1143634, no IL1B genes were "noteworthy". In conclusion, this study showed the relationship between polymorphisms in the IL2 and ANRIL genes with periodontitis, as well as the revalidation of data on meta-analyses focused on polymorphisms in the IL1A and 1B genes with the risk of developing periodontitis demonstrating those as biomarkers for the susceptibility to the disease.

Key words: Cytokines, Periodontal Disease, Alleles, Odds Ratio, Genetic Variation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 CAPÍTULO I	14
2.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1.1 Tecidos periodontais – estrutura e biologia do periodonto.....	16
2.1.2 Periodontite e a resposta do organismo à inflamação	18
2.1.3 Fatores genéticos associados à periodontite	20
2.1.4 Interleucinas 1A, 1B e 1RN.....	23
2.1.5 Interleucina 2	26
2.1.6 Interleucina 4	28
2.1.7 Interleucina 6	29
2.1.8 Interleucina 17A.....	31
2.1.9 Interleucina 18	34
2.1.10 Gene ANRIL	36
2.1.11 Metanálise em estudos genéticos.....	38
2.1.12 Abordagem Bayesiana em metanálises de estudos genéticos.....	40
2.2 OBJETIVOS.....	41
2.2.1 Objetivo Geral	41
2.2.2 Objetivos Específicos.....	41
3 CAPÍTULO II	48
3.1 ARTIGO 1	48
4 CAPÍTULO III	64
4.1 ARTIGO 2	64
5 CAPÍTULO IV.....	86
5.1 ARTIGO 3	86
6 CAPÍTULO V.....	96
6.1 Considerações finais.....	96
6.2 Perspectivas futuras.....	96
ANEXO I – Artigo de metanálise sobre polimorfismos no gene MBL e sua relação com o risco de desenvolvimento de periodontite aceito para publicação na revista <i>Meta Gene</i> .	
ANEXO II – Artigo de metanálise publicado na revista <i>Journal of Clinical and Experimental Investigations</i> abordando a relação bidirecional entre o risco de desenvolvimento de periodontite e a infecção por <i>Helicobacter pylori</i> .	

1. INTRODUÇÃO

A periodontite caracteriza-se como uma doença inflamatória de patogênese complexa (MEYLE; CHAPPLE, 2016) que afeta as superfícies das raízes dentais e os tecidos adjacentes compostos pelo cemento, ligamento periodontal, gengival e osso alveolar (SLOTS, 2017). Sua prevalência varia conforme a população e sofre intenso viés devido a variação metodológica em sua avaliação clínica (NAZIR et al., 2017).

Em um estudo sistemático das doenças bucais no mundo realizado entre 1990 e 2015 aponta que a periodontite grave atingiu nesse período em média 7% da população mundial (KASSENBAUM et al., 2017). Por sua vez, em uma pesquisa aplicada a população não institucionalizada nos 50 estados dos EUA, a periodontite atingiu cerca de 62,3% da população de adultos com mais de 65 anos, os quais apresentaram achados clínicos característicos como perda de inserção clínica em um ou mais dentes e sítios com mais de 4 mm de profundidade de sondagem (EKE et al., 2016). Elevada prevalência da periodontite também foi observada no norte da Itália (AIMETTI et al., 2015) sendo, portanto, considerada um importante problema de saúde pública.

A doença é considerada complexa e multifatorial o qual diversos fatores estão envolvidos no desenvolvimento da doença dentre eles variações genéticas do próprio hospedeiro (SILVA et al., 2016) e fatores ambientais como hábito de fumar, ingestão de bebidas alcoólicas e má higiene bucal (EKE et al., 2012). Na periodontite há destruição dos tecidos ao redor das raízes dos dentes bem como maior reabsorção do osso de sustentação podendo acarretar a perda do elemento dentário (BASCONEZ-MARTINEZ et al., 2011). A intensa resposta inflamatória do organismo é o principal causador dos danos teciduais observados no curso do desenvolvimento da periodontite (SILVA et al., 2016).

Embora o acúmulo de microrganismos na região periodontal seja o fator iniciador da doença (AMAYA et al., 2013), mediadores inflamatórios incluindo citocinas, quimiocinas, metabólitos de ácido araquidônico e enzimas proteolíticas contribuem para a degradação tecidual e reabsorção de osso alveolar observadas na doença (YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013). Além disso, a variedade de fatores genéticos do hospedeiro pode influenciar a susceptibilidade individual ao desenvolvimento da doença, bem como serem capazes de determinar os aspectos clínicos e a taxa de progressão da periodontite (VIEIRA; ALBANDAR, 2014).

A comprovação de que a periodontite é uma doença complexa de etiologia multifatorial tem levado ao desenvolvimento de pesquisas com interesse na

identificação de marcadores moleculares capazes de determinar o risco de desenvolvimento da doença (STABHOLZ; SOSKOLNE; SHAPIRA, 2010).

Recentemente, investigações sobre fatores de susceptibilidade à periodontite vêm ganhando enfoque em genes de moléculas imunorregulatórias como citocinas, quimiocinas, receptores de superfície de membrana e proteínas de reconhecimento de antígenos (CARINCI et al., 2015). Determinadas citocinas como as interleucinas (IL) 1, 4 e 6, dentre outras, são consideradas fatores chave na progressão da periodontite por atuarem no recrutamento, diferenciação e ativação de linfócitos B, infiltrado neutrofílico e estimulação de osteoclastos (NAVARRETE et al., 2014).

Polimorfismos em genes de interleucinas como o IL1A (ARMINGOHAR et al., 2014), IL1B (MASAMATTI et al., 2012), IL2 (VAHABI et al., 2017), IL17A (BORILOVA-LINHARTOVA et al., 2016) e IL17F (ERDEMIR et al., 2015) tiveram papel preponderante no desenvolvimento e progressão da periodontite em diferentes populações. Estes achados demonstram a influência que as variantes genéticas podem ter na expressão gênica de mediadores inflamatórios (KHAZIM et al., 2018) e sua possível relação com a periodontite (SILVA et al., 2017)

Apesar de diversos estudos usando metodologias de determinação de frequência alélica e genotípica por reação em cadeia da polimerase (PCR) (CHAMBRONE et al., 2014; WU et al., 2013; YOSHIHARA et al., 2015) ou associação genômica (OFFENBACHER et al., 2016; DIVARIS et al., 2013) tenham buscado esclarecer a relação entre polimorfismos em citocinas ou outros mediadores inflamatórios e periodontite, os resultados mostram-se falhos pelo número amostral reduzido gerando dados falso-positivos ou falso-negativos (CARINCI et al., 2015).

Nessa perspectiva os estudos de metanálise têm sido cada vez mais empregados em análise genética pela sua maior capacidade de associação de dados anulando os chamados "efeitos curtos" acarretados por estudos com número amostral reduzido (LOHMUELLER et al., 2003). A elevada capacidade de associação de dados feita pela metanálise garante maior confiabilidade aos dados bem como resultados acurados com correto direcionamento do enfoque no desenvolvimento de marcadores moleculares para a doença.

Além disso, os estudos de metanálise representam o topo da evidência científica sendo esta considerada uma ferramenta indispensável para a síntese de dados conflitantes disponíveis na literatura (GOLDEN; BASS, 2013; LEUCHT et al., 2016). Por se valerem de métodos não dispendiosos, os estudos de metanálise vêm como uma

alternativa de produção científica de alta qualidade em meio à falta de financiamento e crise científica Brasileira (PETHERIC, 2017) que ameaçam o futuro da pesquisa no país (REDMOND, 2017).

Metanálises sobre polimorfismos em genes das interleucinas IL-1B (SILVA et al., 2018; ZENG et al., 2015), IL-4 (YAN et al., 2014), IL-6 (SONG et al., 2013), IL-18 (LI et al., 2014) e risco no desenvolvimento de periodontite estão disponíveis na literatura. Contudo, os estudos de metanálise sobre determinantes genéticas podem, ainda, apresentar dados falso-positivos e, portanto, devem ser considerados com cautela ou serem revalidados por meio de abordagens Bayesianas (WACHOLDER et al., 2004; WAKEFIELD et al., 2009).

Visto a importância em se ter dados acurados acerca das metanálises disponíveis, dá-se necessária a revalidação dos achados destes estudos metanálíticos sobre polimorfismos nos genes das interleucinas 1A, 1B, 1RN, 2, 4, 6, 10, 18 por meio de diferentes abordagens que tragam maiores esclarecimentos da influência destas variações genéticas e o risco de desenvolvimento da doença. Bem como também, vista a limitação financeira na pesquisa brasileira em bancada, é necessária a avaliação *in silico* dos dados disponíveis na literatura, sem necessidade de financiamento para experimentos *in vitro* ou *in vivo*, acerca da influência de variações genéticas em regiões regulatórias do DNA como o gene ANRIL, o gene IL2 e o risco no desenvolvimento de periodontite por meio de metanálise.

Este trabalho é dividido em 5 capítulos o qual o primeiro trata do referencial teórico e os objetivos geral e específicos do trabalho. O segundo aborda os resultados compostos por um artigo de metanálise sobre o polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e o risco no desenvolvimento de periodontite crônica publicado na revista *BMC Oral Health* (NOVO QUALIS A2). O terceiro capítulo é composto por um artigo de metanálise sobre o polimorfismo rs1333048 no gene ANRIL e sua associação com o desenvolvimento de periodontite crônica submetido para a revista *Archives of Oral Biology* (NOVO QUALIS A1). O quarto capítulo, por sua vez, aborda um artigo de metanálise com abordagem Bayesiana sobre diferentes polimorfismos em genes de interleucinas e o risco de desenvolvimento de periodontite crônica submetido para a revista *Journal of Dental Research* (NOVO QUALIS A1). Por fim, o quinto capítulo é composto pelas considerações finais e perspectivas futuras do trabalho.

2 CAPÍTULO I

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.1 – Tecidos periodontais – estrutura e biologia do periodonto

O periodonto corresponde a um conjunto de tecidos localizados ao redor das raízes dentais e compreende o cemento, o ligamento periodontal, a gengiva e o osso alveolar (POLIMENI; XIROPAIDIS; WIKESJO, 2006). O periodonto por sua vez, ainda pode ser dividido com base em características morfofuncionais, em periodonto de proteção e periodonto de sustentação (CHO; GARANT, 2000). O entendimento da organização histomorfofuncional dos tecidos periodontais torna-se de considerável importância para a melhor compreensão das alterações e quadros inflamatórios que possam acometer o periodonto.

A gengiva é um tecido epitelial estratificado pavimentoso não queratinizado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011) que recobre o periodonto e age como uma barreira entre o ambiente externo e a região periodontal (CHUNG et al., 2007). A gengiva é preparada para receber a carga mastigatória recobrando os outros tecidos periodontais, seu epitélio juncional sela o periodonto, impedindo a penetração de microrganismos conferindo proteção, sendo estas estruturas unidas pelo ligamento periodontal e suportadas pelo osso alveolar (CHAMBRONE; RAMOS; PAZ, 2015).

Por sua vez, o ligamento periodontal é um complexo sistema conjuntivo rico em vasos sanguíneos, nervos e fibras colágenas ao redor das raízes dos dentes (MIHÁLI; MIHÁLI, 2015). Este sistema conjuntivo apresenta fibras colágenas organizadas que se inserem nos tecidos ósseos do cemento e osso alveolar contribuindo assim para a fixação dental (LIN et al., 2017). Também classificado como uma articulação fibrosa dinâmica, o ligamento periodontal participa do deslocamento do dente dentro da cavidade óssea alveolar nos movimentos ortodônticos (MCCULLOCH; LEKIC; MCKEE, 2000) bem como equilibra e distribui as forças mastigatórias (LIN et al., 2017).

O ligamento periodontal apresenta zonas diferenciadoras na inserção com o cemento e com o osso alveolar interagindo com estes componentes nas suas faces de inserção com inúmeros tipos celulares (LEE et al., 2015), especialmente células tronco mesenquimais, os quais vêm recebendo considerável destaque na literatura devido a sua maior capacidade regenerativa (MURAKAMI et al., 2016). Esta capacidade vem sendo estudada não somente para o tratamento da doença periodontal (HYNES et al.,

2013), mas também encefalomielite (TRUBIANI et al., 2016) e a regeneração de defeitos ósseos (CHEN et al., 2016).

Recobrimo as raízes dentais tem-se o cemento caracterizado como um tecido dental mineralizado compondo parte do aparato de inserção dentro do periodonto (HO et al., 2009). Funcionalmente, ao redor das raízes dentais, o cemento dá suporte às fibras de colágeno do ligamento periodontal e, portanto, fixa o dente ao osso alveolar (GREZSIK; NARAYANAN, 2002). Este tecido é formado por células denominadas cementoblastos, responsáveis pela síntese de matriz mineralizada, os quais, após ficarem presos a esta matriz, passam a ser chamados de cementócitos (SCHROEDER, 2012).

Este tecido mineralizado por sua vez pode ser classificado em dois tipos: o cemento acelular e o cemento celular (YAMAMOTO et al., 2016). O cemento acelular é encontrado principalmente na superfície cervical das raízes dentais recobrimo de 40 a 70% da raiz (GONÇALVES et al., 2005) contendo significativa quantidade de fibras sem componentes celulares (THOMAS, 2003). Por outro lado, o cemento celular, que recobre as regiões inter-radiculares e apicais das raízes dentais, contém tanto fibras quanto cementócitos (NANCI; BOSSHARDT, 2006).

A principal função do cemento é suportar a ancoragem do dente em conjunto com as fibras do ligamento periodontal e o osso alveolar subjacente (CREANOR, 2016). Nesse papel, o cemento acelular é considerado o mais adequado, devido sua natureza predominantemente proteica e mineral dando maior suporte na ligação com os ossos da maxila ou mandíbula (NANCI; 2008).

Servido de sustentação ao dente há o osso alveolar formado por tecido mineralizado esponjoso que compõe os ossos da maxila e mandíbula. Na fisiologia do tecido ósseo alveolar é observada a ação do Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kB (RANKL), seu receptor o Receptor Ativador do Fator Nuclear kB (RANK) e de seu antagonista natural, a osteoprotegerina (OPG) (BUDUNELI; KINANE, 2011).

RANK/RANKL promovem a diferenciação de macrófagos em osteoclastos maduros multinucleados estimulando sua capacidade de reabsorção óssea (MORI, 2013). RANKL é produzido e secretado por diversos tipos celulares, dentre eles fibroblastos, linfócitos T e mesmo monócitos (LIU; LERNER; TENG, 2010) os quais os linfócitos T e B são considerados como fonte primária de RANKL na reabsorção óssea alveolar decorrente de quadros inflamatórios no periodonto (KAWAI et al., 2006).

2.1.2 – A periodontite e a resposta do organismo à inflamação

Um dos quadros patológicos característicos que pode afetar os tecidos periodontais é a doença periodontal. Esta desordem é classificada como uma alteração de cunho crônico, inflamatório e multifatorial com progressiva perda óssea alveolar que, em caso de não tratamento, gera perda do dente (LUO et al., 2017). A doença ainda representa um grave problema de saúde pública e um desafio na clínica odontológica pela limitação na capacidade regenerativa dos tecidos periodontais (NUNEZ et al., 2019).

As doenças periodontais resultam de um processo inflamatório em resposta à presença de microrganismos no periodonto, sendo classificadas como gengivite, com inflamação inicial e sangramento gengival sem destruição tecidual que pode evoluir para a periodontite (WOLF; LAMSTER, 2011). A periodontite apresenta estrutura polimicrobiana denominada biofilme dental (NEDZI-GÓRA, KOWALSKI, GÓRSKA, 2017), esse biofilme composto por uma colonização mista de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas no sulco subgengival acarreta a resposta do organismo por meio da produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios pelo epitélio e submucosa gengivais e desenvolvimento de bolsas periodontais (ISMAIL et al., 2013).

A periodontite atingiu cerca de 62,3% de adultos acima de 65 anos nos Estados Unidos (EKE et al., 2016) o qual no período de 2009 a 2012 64,7 milhões de adultos tiveram periodontite, e 8,9% desse total desenvolveu a forma grave da doença (EKE et al., 2015). Elevada prevalência da periodontite também foi observada no norte da Itália (AIMETTI et al., 2015) e no Brasil (SUSIN; HAAS; ALBANDAR, 2014) sendo, portanto, considerada um importante problema de saúde pública. Contudo, sua variedade em apresentação clínica e diagnóstico ainda torna subestimada a real prevalência da doença na clínica (PAPAPANOU, SUSIN, 2017).

Duas formas principais de periodontite se apresentam com elevada frequência na clínica odontológica: as formas crônica e agressiva (do inglês *Chronic Periodontitis* – CP; e *Aggressive Periodontitis* – AgP) (LÓPEZ; BAELUM, 2015). A periodontite crônica é caracterizada por uma resposta imune que ocorre de forma cíclica com períodos de estabilidade e manutenção da inflamação, seguidos por períodos de rápida destruição tecidual atingindo indivíduos adultos em sua maioria (FORD; GAMONAL; SEYMOUR, 2010). Por sua vez, as manifestações clínicas da periodontite agressiva incluem rápida

e extensa lesão tecidual no periodonto atingindo indivíduos mais jovens (MONTEIRO et al., 2015).

Existem poucas diferenças histopatológicas entre as formas crônica e agressiva da periodontite (KEBSCHULL et al., 2013), diferenças estas que não foram significativas no perfil de citocinas presentes no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica comparados a pacientes com a forma agressiva da doença (DUARTE et al., 2015). Contudo, frequentemente os achados clínicos da periodontite agressiva não incluem lesão gengival, o que sugere que esta pode não seguir a mesma sequência de iniciação e progressão da periodontite crônica (FORD; GAMONAL; SEYMOUR, 2010).

Seu diagnóstico se baseia na determinação de parâmetros clínicos e radiográficos tais como a medida de profundidade de sondagem (do inglês *Mean Pocket Depth* - MPD), em milímetros, e perda de inserção clínica (do inglês *Clinical Attachment Loss* - CAL), também em milímetros (PAKE, EKE, 2007). Valores de MPD e CAL ≥ 3 mm no mesmo sítio periodontal indicam presença da periodontite, os quais as variações crescentes nestes valores permitem a classificação da doença em níveis de discreta, moderada e/ou severa (PAKE, EKE, 2012).

Outras formas clínicas da doença também podem ser destacadas como a forma agressiva localizada, presente especificamente na região do primeiro molar em ao menos dois dentes permanentes, e a forma agressiva generalizada com perda de inserção interproximal afetando ao menos três dentes permanentes afetando pacientes com 30 anos ou mais (ALBANDAR 2014). Além destas, observa-se variações das formas crônicas em leve, moderada e severa com achados de perda óssea menor que um terço da raiz dental, mais que um terço até dois terços e mais que em dois terços da superfície radicular, respectivamente (MITTAL et al., 2013). Bem como, outras formas como a de início precoce e juvenil também podem ser citadas (HIGHFIELD et al., 2009; PATRA 2019). Entretanto um recente estudo reorganizou as classificações clínicas da periodontite dissolvendo estas formas de classificação (CATON et al., 2018).

É evidente que a periodontite possui etiologia multifatorial e embora os microrganismos detenham a função de iniciar a resposta inflamatória, fatores genéticos do próprio hospedeiro, tais como polimorfismos em citocinas, contribuem com os danos observados no periodonto (SILVA et al., 2016; 2017a; 2017b; 2018). Nos sítios periodontais observa-se a infiltração inflamatória com recrutamento de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) e macrófagos (ANDIA et al., 2013; OZMERIC,

2004) que liberam fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL) 1 e 17, dentre outras, e prostaglandina E₂ (PGE₂) pela liberação de lipopolissacarídeos (LPS) oriundos de periodontopatógenos (CARDOSO et al., 2009; CAVALLA et al., 2014; NIBALI et al., 2009; SHAO et al., 2009).

O envolvimento dos PMNs na patogênese da periodontite é uma evidência peculiar, visto sua maior associação ao processo inflamatório agudo e a periodontite ter caráter crônico, contudo tais células são produtoras de mediadores inflamatórios como a IL-8 e a molécula de adesão celular 1 (ICAM-1), com ação na periodontite definida pela potencialização do infiltrado neutrofílico, intensa destruição do periodonto de sustentação e aumento da reabsorção óssea pela via RANK-RANKL (LIU et al., 2001).

Por outro lado, contrabalanceando a atividade do RANKL há a ação da OPG. Também produzida por fibroblastos, monócitos, além de linfócitos T e B, a OPG atua bloqueando a osteoclastogênese (HOFBAUER; SHOPPET, 2002). A expressão de RANKL assim como de OPG, em quadros fisiológicos normais, é mediada por interações célula-célula (THEOLEYRE et al., 2004). Entretanto, moléculas como a IL-1 induzem maior síntese de RANKL por células da medula óssea e conseqüentemente maior reabsorção de tecido ósseo (BOYCE; XING, 2008) além de que a IL-8, quimiotática para neutrófilos e também secretada por este tipo celular, induz a expressão de TNF- α com recrutamento de linfócitos T que ao secretarem RANKL podem trabalhar como indutores da reabsorção óssea (BAKER, 2000).

Observa-se que as citocinas liberadas além de modularem o curso da inflamação também atuam sobre a reabsorção óssea, sendo importantes mediadores inflamatórios na fisiopatologia da doença (ALI et al., 2011; BAKER, 2000). Essa perda de osso alveolar constitui a maior das preocupações, tanto para os pacientes quanto para os clínicos onde as tentativas de tratamento se voltam para a regressão desta perda ou minimização dos danos (JAYAKUMAR et al., 2010).

Ambas células T e B possuem longa meia-vida nos tecidos periodontais (KULRKANI; KINANE, 2014) o quais níveis elevados nas populações de linfócitos CD45, CD3 e CD4 foram encontrados na circulação sanguínea de pacientes com a forma agressiva da doença (CIFCIBASI et al., 2015) evidenciando seu papel na progressão da doença. A ativação e efeito biológico dessas células definem não somente o curso da inflamação nos tecidos periodontais, bem como uma resposta sistêmica com alterações em diversos órgãos (HASTURK; KANTARCI, 2015).

Estes achados demonstram a importância de estudos com foco na investigação sobre interleucinas bem como outros mediadores inflamatórios e variações genéticas nestas moléculas os quais podem trazer impactos positivos na abordagem clínica de pacientes com a doença.

2.1.3 – Fatores genéticos associados à periodontite

A periodontite detem vários fatores de risco os quais fenômenos metabólicos, genéticos e microbianos estão envolvidos na patogênese da doença (SILVA et al., 2016). A colonização de bactérias periodontais Gram-negativas incluindo as espécies *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* é indicada como iniciador da doença (FENG; WEINBERG, 2006; PUIG-SILLA et al., 2012) e ativadora das vias inflamatórias (ANDIA et al., 2013).

Foi inicialmente sugerido que a susceptibilidade à periodontite poderia ser geneticamente determinada pela resposta imune a lipopolissacarídeos bacterianos (MICHALOWICZ, 1993). No entanto, uma vez que os LPS's não são o único produto bacteriano envolvido na inflamação periodontal, bem como é reportado na literatura o histórico familiar e a carga genética tem papel preponderante no desenvolvimento da doença (ZIUKAITE et al., 2016). Evidentemente fundo genético de susceptibilidade à periodontite permanece em grande parte ainda desconhecido (CARINCI et al., 2015).

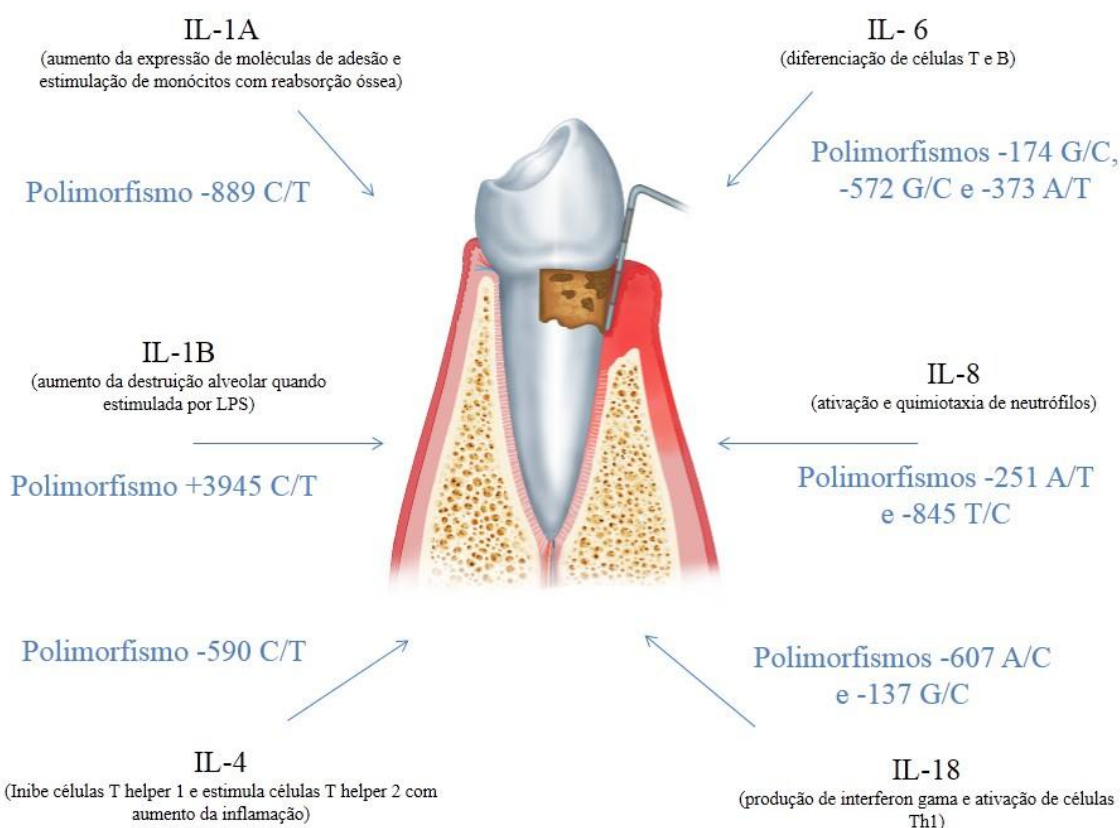
A inflamação crônica e as citocinas têm sido sugeridas como detentoras de papel central nos processos destrutivos observados na periodontite (DEO; BHONGADE, 2010). Relatos de polimorfismos genéticos em citocinas associados à periodontite vem crescendo recentemente na literatura e vários estudos têm mostrado que tais moléculas estão diretamente envolvidas na periodontite. Por exemplo, verificou-se que os polimorfismos ocorridos em diferentes regiões de genes IL1A e 1B (KARIMBUX et al., 2012), IL4 (HOLLA et al., 2008), IL6 (KALBURGI et al., 2010), IL8 (SCAREL-CAMINAGA et al., 2011) e IL18 (NOACK et al., 2008) influenciam na fisiopatologia da periodontite sob diferentes mecanismos.

Polimorfismos genéticos representam variações com frequências superiores em mais de 1% da população relacionadas ao risco de desenvolvimento de doenças e que podem ocorrer como mutação de ponto (Polimorfismos de Base-Única, do inglês SNP – *Single Nucleotide Polymorphisms*) ou em uma sequência de bases que se repetem com número variado dentro do gene (Polimorfismos de repetição em *tandem* – VNTR)

(CHAPMAN; HILL, 2012). Estes SNP's foram abordados em estudos de metanálise como demonstrado na figura 1 sendo sugeridos por possivelmente alterar o risco de desenvolvimento da doença em várias populações.

Yan et al., (2014) realizaram um estudo de metanálise abordando três diferentes variações genéticas no gene IL4 e encontraram uma associação significativa para o polimorfismo -590 C/T e a doença (Figura 1). A IL-4 tem capacidade em inibir células T helper 1 (Th1) enquanto estimula a resposta imune via Th2, além de afetar negativamente a atividade de macrófagos (KIDD, 2003). Esta estimulação de células Th2, embora com atividade anti-inflamatória (SCHUERGWEGH et al., 2003) é indicada como fator contribuinte para destruição tecidual observada na periodontite (GEMMELL; SEYMOUR, 2004).

Figura 1. Polimorfismos genéticos nas interleucinas (IL)-1A, IL-1B, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-18, e seus possíveis mecanismos de ação, abordados em estudos de metanálise os quais podem influenciar na progressão da periodontite (representada ao centro da figura pela ilustração de um dente cortado no eixo coronal com demonstração do processo inflamatório, destruição tecidual, reabsorção óssea e aumento da profundidade de sondagem medida por instrumento específico – sonda periodontal).



Fonte: Próprio autor

A IL-6 também foi abordada em estudos de metanálise (SHAO et al., 2009; SONG et al., 2013). Esta citocina e o polimorfismo -373 A/T em seu gene estiveram associados à diminuição no risco de desenvolvimento de periodontite crônica em japoneses, bem como na redução dos níveis séricos de IL-6 nestes pacientes (KOMATSU et al., 2005). IL-6 é uma citocina envolvida na resposta inflamatória e modulação da resposta imune incluindo a diferenciação de células B e T (LOOS; JOHN; LAINE, 2005). Também, os polimorfismos -174 G/C e -572 G/C aumentaram a expressão do gene IL6, os quais podem ser associados à periodontite (SONG et al., 2013) (Figura 1).

Uma outra metanálise disponível na literatura e publicada por Chen et al., (2015) também trouxe informações esclarecedoras sobre os polimorfismos -251 A/T e -845 T/C no gene IL8 e a significativa associação com periodontite em população brasileira. A IL-8 é uma importante citocina responsável pela ativação e quimiotaxia de células de defesa, especialmente neutrófilos, para os sítios inflamatórios (REMICK, 2005; SCAPINI et al., 2000) (Figura 1). Os níveis de IL-8 no fluido gengival de pacientes com periodontite agressiva e crônica foram significativamente mais elevados que nos controles saudáveis demonstrando a relação entre esta citocina e periodontite (ERTUGRUL et al., 2013).

Avaliando os níveis séricos de outra citocina pro-inflamatória em associação com periodontite, a metanálise de Li et al., (2014) abordou dois polimorfismos (-607 A/C e -137 G/C) no gene IL18 em nove estudos caso controle com um total de 576 pacientes com periodontite e 458 controles (Figura 1). O estudo identificou associação positiva entre elevados níveis desta citocina em pacientes portadores de ambos os polimorfismos e a doença.

A IL-18 é secretada por monócitos e macrófagos o qual seu precursor, naturalmente presente em células endoteliais, queratinócitos e células do epitélio intestinal, é ativado por meio de processamento pela protease caspase-1 com indução da síntese de interferon gama e consequente ativação de vias inflamatórias as quais resultam em destruição tecidual nos quadros de periodontite (DINARELLO et al., 2013).

Estes achados reforçam a importância em identificar e esclarecer o papel de variantes genéticas no desenvolvimento, progressão e até mesmo diagnóstico molecular da periodontite evitando assim os irreversíveis danos ao periodonto, perda do dente e prejuízos aos indivíduos acometidos.

2.1.4 Interleucinas 1A, 1B e 1RN

Dentre as citocinas mais estudadas com enfoque na sua associação com a periodontite tem-se as da família das interleucinas 1, o qual detém cerca de 11 membros, foi uma das primeiras classes de interleucinas estudadas se caracterizando por terem papel principal em processos inflamatórios (DINARELLO, 2009; GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010). O efeito geral da IL-1 é a estimulação do sistema nervoso central, especialmente o eixo hipotálamo-adrenal, acarretando elevação da temperatura corporal (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002) e consequente aumento da migração de leucócitos (HOPKINS, 2003).

A IL-1 também promove indução da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais que em conjunto com a liberação de outras citocinas resulta na amplificação do recrutamento de neutrófilos e resistência à infecção (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013). Além disso, este mediador inflamatório também é capaz de prolongar a meia-vida e a função efetora de neutrófilos e macrófagos (MANTOVANI et al., 2011).

As citocinas IL-1A e IL-1B são codificadas no cluster da família IL-1 localizado ao longo do braço longo do cromossomo 2 na região 2q13-21 (NICLKIN; WIETH; DUFF, 1994) e embora liguem-se ao mesmo receptor celular (IL-1R1), estas interleucinas apresentam diferenças fisiológicas que promovem distintas respostas imunes (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013).

O precursor da IL-1A está presente constitutivamente em células epiteliais do trato gastrointestinal (BERSUDSKY et al., 2013), fígado (TAKEDA et al., 2004) e em queratinócitos da pele (KONG; GRANDO, 2006). Este precursor é totalmente ativo e funciona como um “alarme” molecular iniciando rapidamente a cascata inflamatória (CHEN et al., 2007). Quando ocorre formação de células necróticas, bem como em quadros de isquemia, este precursor é liberado mediando a fase inicial da inflamação (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013).

A IL-1A está implicada na patogênese da inflamação periodontal por estimular a produção de mediadores secundários os quais amplificam a inflamação levando a degradação do tecido conjuntivo de suporte no periodonto (GRAVES; COCHRAN, 2003) e estimulação de monócitos com consequente reabsorção óssea (MANEY; OWENS, 2015) – visto que a relação causa e efeito entre liberação de citocinas e perda óssea alveolar já fora demonstrada (ALGATE et al., 2015; DELIMA et al., 2001; IZAWA

et al., 2014). A IL-1A promoveu maior reabsorção óssea em ratos que receberam injeção subgengival de LPS das espécies bacterianas: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* (NISHIDA et al., 2001) e também aumentou a diferenciação *in vitro* de osteoclastos (TANABE et al., 2005).

Por sua vez, ligando-se ao mesmo receptor celular, mas com diferenças fisiopatológicas, tem-se a IL-1B. Diferentemente da IL-1A, o precursor da IL-1B não está presente em estados fisiológicos sendo um produto primário da ativação de monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (JOOSTEN; NETEA; DINARELLO, 2013). A IL-1B também está implicada na estimulação da reabsorção óssea em modelo animal (NISHIDA et al., 2001) bem como na fisiopatologia da doença periodontal o qual elevados níveis de IL-1B em fluido gengival foram encontrados em pacientes com periodontite severa (ENGBRETSON et al., 2002). Estes autores identificaram maior associação entre o aumento nos parâmetros clínicos de avaliação da periodontite (medida de profundidade de sondagem e nível de perda de inserção clínica) e os níveis de IL-1B.

Embora os níveis de IL-1B em fluido gengival não diferiram quando comparou-se indivíduos fumantes com periodontite e não fumantes também com a doença (BOSTRÖM; LINDER; BERGSTRÖM, 2000), sabe-se que hábito de fumar potencializa os danos causados pela periodontite (BOROJEVIC, 2012). Além disso, a IL-1B tem importante papel na doença periodontal o qual a associação entre elevados níveis tanto de IL-1A quanto IL-1B em fluidos corporais e inflamação são bem reportadas na literatura (DINARELLO; SIMON; VAN DER MEER, 2012; GRAUDAL et al., 2002).

IL-1A e IL-1B estão localizados no mesmo *cluster* gênico jusante ao gene do receptor antagonista da IL-1 (IL-1RN) (DINARELLO et al., 2013). O gene IL-1RN pode ser expresso como diferentes formas proteicas dependendo do processo de *splicing* alternativo (KHAZIM et al., 2018) sendo responsável pela expressão da proteína IL-1Ra em diferentes tipos celulares tais como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais (ORTIZ et al., 2003). Esta proteína se se liga ao receptor IL-1R1 sem mediar sinais moleculares devido à falta de um domínio de interação da proteína acessória do receptor e, assim, inibe a sinalização pró-inflamatória pelas IL-1A ou 1B como um fator de ligação competitivo (AKDIS et al., 2016).

A expressão do gene IL-1RN e consequente produção de IL-1Ra é associada a efeitos imunossupressivos os quais a ausência da expressão desta molécula tornou células tronco mesenquimais menos efetas em induzir, *in vitro*, a polarização de

macrófagos do fenótipo M1 para M2 (LUZ-CRAWFORD et al., 2016). Elevados níveis séricos de IL-1Ra são observados em indivíduos com obesidade (MEIER et al., 2002), resistência à insulina (HERDER et al., 2016) e diabetes mellitus tipo 2 (HERDER et al., 2009), sendo tais níveis explicados pela maior carga inflamatória representada pela IL-1A e IL-1B e portanto maior expressão de IL-1RN (HERDER et al., 2009).

Variações genéticas no cluster gênico da IL-1 pode promover efeitos deletérios como por exemplo afetar a expressão de transcritos anti-senso do gene IL1A (AS-IL1A), o qual controla a transcrição induzida deste gene (CHAN et al., 2015). Ao total, 148 polimorfismos são descritos no gene IL1A, 144 no gene IL1B e 140 no gene IL1RN (NCBI, 2019), sendo que diversos estudos de metanálise abordaram diferentes polimorfismos nestas interleucinas e o risco de desenvolvimento de desordens inflamatórias como a periodontite (CHEN et al., 2015; DENG et al., 2013; KARIMBUX et al., 2012; MAO et al., 2013; NIKOLOPOULOS et al., 2008; SILVA et al., 2017; SILVA et al., 2018; WANG et al., 2014; ZENG et al., 2015).

Embora as metanálises tragam resultados acurados acerca de variações genéticas nos genes IL1A, 1B e 1RN e periodontite, os resultados destes estudos podem apresentar dados falso-positivos e requerem uma revalidação dos mesmos para melhor entendimento do papel destes fatores na periodontite.

2.1.5 Interleucina 2

A IL-2 é uma citocina secretada por células T CD⁴⁺ em órgãos linfoides secundários capaz de aumentar a habilidade de fagocitose e citotoxicidade de células NK (LÉTOUNEAU et al., 2009), manter a proliferação homeostática das células T reguladoras (células Treg) e das próprias células T CD⁴⁺ (FURTADO et al., 2002), atuar sobre células linfoides inatas e modular a diferenciação de células T efetoras, além de ter ações nas células T de memória, células T efetoras e monócitos (BALLESTEROS-TATO et al., 2012; PIPKIN et al., 2010).

A estrutura molecular da IL-2 compreende quatro curtas cadeias α hélices globulares glicosiladas de 15 kDa (ROSS; CANTRELL, 2018) o qual sua secreção é dependente da indução transcricional por sinais emitidos por células T no gene IL2 e estabilização do RNA mensageiro para IL-2 (MALEK et al., 2008). O gene IL2 apresenta duas importantes características de padrão de expressão ligadas às linhagens de células T e indutores inflamatórios, primeiro a expressão deste gene é quase que exclusiva destas células, salvo relatos que mostram esta expressão por

outros tipos celulares (GRANUCCI et al., 2003). Segundo, a IL-2 não pode ser expressa em células T em repouso requerendo assim a ativação destas por meio de receptores de células T e outros sinais de ativação (BUNTING; WANG; SHANNON, 2006; MALEK et al., 2008).

Polimorfismos e seus haplótipos no gene IL2 vem sendo associados à diversas condições inflamatórias tais como colite ulcerativa (FESTEN et al., 2009), artrite reumatoide (MADDAH et al., 2016; TRJKOV et al., 2009) e câncer (MELCHIADES et al., 2017; ZHANG et al., 2016) bem como os níveis de IL-2 sendo sugestivos como potenciais biomarcadores para avaliação do curso de doenças (LIANG et al., 2015). Estes níveis mostram-se alterados e relacionados à patogênese do lúpus eritematoso sistêmico (BRUGOS et al., 2012), vitiligo e periodontite (ANDRUKHOV et al., 2011; GOSKA et al., 2003).

Contudo os achados acerca da associação entre níveis de IL-2 e periodontite mostram-se contraditórios. Por exemplo, Al-Ghurabei (2012) comparou os níveis séricos de IL-1B e IL-2 de 50 pacientes diagnosticados com periodontite crônica com 25 controles saudáveis por ensaio imunoenzimático (ELISA) identificando aumento significativo na média de IL-1B enquanto para os dados sobre os níveis de IL-2 não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Achados semelhantes foram identificados por Chen et al. (2015) em que o perfil de citocinas no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica não diferiu dos controles saudáveis.

Tais achados contraditórios também são observados a nível genético. Um dos polimorfismos mais bem estudados com a possível associação com doenças inflamatórias é o SNP na posição -330 (com mudança de uma timina para guanina) na região promotora do gene IL2, conseqüentemente afetando a transcrição gênica e expressão de IL-2 identificado por Jonh et al. (1998). O primeiro estudo focando nesta variação genética e periodontite foi publicado em 2002 e realizado por Scarel-Caminaga et al. (2002) em que o próprio estudo apresenta resultados divergentes.

Primeiramente, os autores não identificaram uma associação significativa entre o polimorfismo -330 T/G e a doença ($P > 0,05$). A associação significativa apenas foi observada quando o grupo controle foi combinado com o grupo com periodontite moderada e comparado aos outros grupos do estudo. Desta forma, o polimorfismo teve associação com a forma severa da doença. Também, uma significativa associação foi identificada tanto na análise genética e alélica em asiáticos (LI et al., 2012). Contudo,

após teste de regressão logística ser aplicado aos dados, o polimorfismo não mais foi significativamente associado à periodontite.

Resultados contraditórios em avaliações genéticas são um desafio ao entendimento da fisiopatologia e influência da carga genética dos indivíduos no desenvolvimento de doenças. Outros estudos acerca da relação entre o polimorfismo -330 T/G e periodontite estão disponíveis na literatura (MAJUMDER et al., 2018; VAHABI et al., 2018). Entretanto, um estudo de metanálise que possa agrupar os dados conflitantes disponíveis na literatura não está disponível e é requerido para melhor entendimento desta variante genética e o risco de desenvolvimento de periodontite.

2.1.6 Interleucina 4

A IL-4 é considerada uma citocina multifuncional produzida principalmente por células T ativadas, mastócitos, basófilos e eosinófilos o qual compartilha sequências homólogas, receptores celulares e sinalização intracelular com a IL-13 (LUZINA et al., 2012). Este mediador é produzido pela resposta mediada via Th2 com papel de proteção contra infecções por parasitos extracelulares mas também participante da patogênese da asma e de outras desordens inflamatórias (ZHU, 2015).

Esta IL tem a capacidade em inibir células Th1 enquanto estimula a resposta imune via Th2, além de afetar negativamente a atividade de macrófagos em sinergismo com a IL-13 (KIDD, 2003). Além disso, variados *splicings* na IL-4 são capazes de promover inflamação linfocitária *in vivo* o qual uma maior expressão destas variantes moleculares causaram maior infiltração de linfócitos T e B nos pulmões (LUZINA et al., 2011).

Esta estimulação de células Th2 é indicada como fator contribuinte para destruição tecidual observada na periodontite (GEMMELL; SEYMOUR, 2004). A IL-4 promoveu aumento na migração de linfócitos Th2 para sítios periodontais lesionados por meio da indução de CCL11 por células do ligamento periodontal (HOSOKAWA et al., 2016). Por sua vez, em um modelo de indução de periodontite por injeção de LPS no sulco gengival de ratos e imunização destes também com injeção intraperitoneal de LPS houve maior perda dano periodontal no grupo imunizado com aumento na contagem de células positivas para IL-4 que no grupo não imunizado (IZUMI et al., 2018).

Entretanto é interessante destacar que em relação à biologia óssea, a IL-4 tem papel protetor o qual o importante papel desta IL nas infecções ósseas da mandíbula é

demonstrado pelo fato de que os camundongos, com alta produção de IL-4, não exibem formação de osteoclastos e reabsorção óssea perirradicular quando infectados nas polpas dentárias com *Porphyromonas gingivalis* (STASHENKO et al., 2007). Tal resultado contrasta com os resultados de camundongos controle que apresentaram intensa positividade para osteoclastos e extensa perda óssea ao redor dos ápices das raízes.

Estes achados corroboram com outro estudo em que a IL-4, *in vitro*, liberada por fibroblastos coletados de pacientes saudáveis inibiu a osteoclastogênese (UJIIE et al., 2016). Esse aspecto protetor da IL-4 pode ser evidenciado pelos resultados de uma metanálise (STADLER et al., 2016) em que houve aumento no seu valor no fluido gengival após tratamento não cirúrgico para periodontite porém sem danos ósseos (*Standardized Mean Difference* = 0,81, $p=0,002$).

Variações no gene IL4 interferem diretamente na expressão e produção de IL-4 (BABULA et al., 2005; HUSSEIN et al., 2013). Três polimorfismos são bem descritos e estudados quanto a sua possível relação com o risco de desenvolvimento de periodontite: o polimorfismo -590 C/T (WINGS et al., 2012; SCAPOLI et al., 2011), +33 C/T (ANOVAZZI et al., 2010; JAIN et al., 2013) e um VNTR de 70-pares de bases (HOLLA et al., 2008).

Estas variantes genéticas foram alvo de duas recentes metanálises (JIA et al., 2017; YAN et al., 2014) demonstrando a sua relação com a periodontite. Nos resultados da metanálise de Yan et al. (2014), apenas o polimorfismo -590 C/T foi significativamente associado ao maior risco de desenvolvimento de periodontite crônica em população Caucasiana tanto na comparação do alelo mutado com o alelo selvagem (*Odds Ratio* = 1,2, $p=0,03$) quando comparados os o genótipos homocigoto mutado com o selvagem (*Odds Ratio* = 1,68, $p=0,03$).

Entretanto, embora haja valores estatisticamente significativos para estes achados, dá-se necessária a revalidação destes dados por métodos estatísticos acurados que possam comprovar a real validade de tais dados sobre polimorfismos no gene IL4 e o risco de periodontite e seu potencial uso como marcador molecular para a doença.

2.1.7 Interleucina 6

A IL-6 humana é uma proteína composta de 212 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 28 aminoácidos, e codificada pelo gene IL6 localizado no

cromossomo 7 na posição 7p21 (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). A expressão do gene IL6 é ativada pela ação da IL-1B e do TNF- α o qual a IL-6 é controlada em vários níveis por micro RNA's (VISWANATHAN et al., 2009), proteínas de ligação a RNA (MASUDA et al., 2013) e fatores de controle circadianos, como o produto do gene Per1 (SUGIMOTO et al., 2014).

Células como linfócitos T e B, monócitos e fibroblastos produzem IL-6 o qual transmite sinais celulares seja pela ligação convencional ao seu receptor celular seja pela ligação ao seu receptor solúvel (IL-6R) (ROSE-JOHN et al., 2006). O resultado destes sinais celulares culmina com respostas rápidas como a liberação de proteínas de fase aguda, indução de febre (CROSTEIN, 2007) e respostas crônicas como a indução da diferenciação de células B e produção de anticorpos (TANAKA; KISHIMOTO, 2014).

A IL-6 também afeta células T induzindo a diferenciação específica de células T CD4⁺ *naïve* inativas em subconjuntos de células T efectoras. Em combinação com fatores de crescimento para linfócitos T, a IL-6 induz preferencialmente a diferenciação de células T CD4⁺ em células Th17, mas inibe o desenvolvimento de células T_{reg} (KIMURA; KISHIMOTO, 2010). Níveis alterados de IL-6 são observados em diversas condições inflamatórias tais como retinopatia diabética (FENG et al., 2018) em que um aumento na concentração desta IL foi determinado no humor aquoso dos indivíduos acometidos com a patologia. Também, elevados níveis foram observados em pacientes com artrite reumatoide, como demonstrado em estudo de metanálise disponível na literatura (WEI et al., 2015).

A expressão de IL-6 está diretamente relacionada a variações alélicas no seu gene (PANTSULAIA et al., 2012). Sabe-se que o gene IL6 possui cerca de 50 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em sua região promotora, como as variantes -597 G/A, -572 G/C, -373 A/T e -174 G/C, entre outros (FISHMAN et al., 1998; OLIVIERI et al., 2002; TERRY, LOUKACI, GREEN, 2000). Vários estudos questionam o papel funcional do SNP -174 G/C na produção de IL-6 tanto *in vivo* (BONAFE et al., 2001; BRUUNSGAARD et al., 2004) quanto *in vitro* (OLIVIERI et al., 2002; TERRY, LOUKACI, GREEN, 2000). A mudança das bases de guanina para citosina (G \rightarrow C) na posição -174 parece afetar a transcrição do gene IL6 e, portanto, os níveis plasmáticos dessa citocina em jovens (OLIVIERI et al., 2002), idosos (BONAFE et al., 2001) e indivíduos centenários (BRUUNSGAARD et al., 2004; DI BONA et al., 2009).

Spoto et al. (2015) observaram que pacientes homozigotos para o alelo mutado neste polimorfismo, acometidos por doença cardiovascular, tiveram maiores níveis de IL-6 que os pacientes heterozigotos e homozigotos selvagens ($p=0,04$). Tais níveis aumentados também foram observados em brasileiros homozigotos para o alelo C com diabetes mellitus tipo 2 (RODRIGUES et al., 2017). Contudo, não foi observada significância estatística nessa associação e também o estudo apresentou um importante viés, os níveis de IL-6 relacionados com o genótipo foi dosado agrupando pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e os controles.

Por sua vez, Kavitha, Vijayashree Priydarshini e Sivapathasundharam (2016) identificaram significativa associação entre o polimorfismo -174 G/C em paciente com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite o qual o alelo C foi considerado como fator de risco para desenvolvimento da doença periodontal nestes pacientes. Por outro lado, em um estudo conduzido em população chinesa, quando avaliados os polimorfismos -174 G/C, -597 G/A e -572 G/C, apenas este apresentou frequências alélicas distribuídas entre os pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite (XIAO et al., 2009). Os alelos mutados em ambos os polimorfismos -174 G/C e -597 G/A não foram identificados neste grupo de participantes do estudo com consequente ausência de associação para o risco de periodontite.

Vários estudos caso/controle estão disponíveis na literatura acerca da possível associação genética entre polimorfismos no gene IL6 e o risco de periodontite em suas diversas formas clínicas (BABEL et al., 2006; CHATZOPOULOS et al., 2018; HOLLA et al., 2004; PIRIM GORGUN et al., 2017; SALMAN et al., 2016; TOKER; GORGUN; KORKMAZ, 2017). Por conseguinte, várias metanálises também estão disponíveis na literatura com o objetivo de sintetizar os dados acerca de variantes genéticas no gene IL6 e o risco da doença (BELTRAMI; CONFALONIERI, 2016; NIKOLOPOULOS et al., 2008; SHAO et al., 2009; SONG et al., 2013; ZHAO et al., 2018; ZHU et al., 2016).

Neste contexto, os dados apresentados pelas metanálises apresentam-se tanto estatisticamente significativos quanto não. Para o entendimento da real veracidade dos resultados destas metanálises é necessário o desenvolvimento de um estudo com ferramentas estatísticas robustas que promova o aumento da acurácia dos dados encontrados e a real relação entre estes polimorfismos e o risco de desenvolvimento de periodontite.

2.1.8 Interleucina 17A

A IL-17A faz parte de um conjunto de citocinas pró-inflamatórias secretadas por um grupo específico de células T CD4+, as chamadas células Th17 (GAFFEN, 2009). Existem seis tipos conhecidos de IL-17 (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E – também denominada IL-25 e IL-17F) sendo as IL-17A e F as mais bem descritas (JIN; DONG, 2013).

Esta interleucina é responsável pelo recrutamento de neutrófilos por meio da indução de diversos mediadores pró-inflamatórios tais como metaloproteinases de matriz, TNF- α , IL-6 e IL-8 (CHENG; HUGHES; TAAMS, 2014). Células T CD4+ expressam a IL-17A em sua superfície celular (LANGRISH et al., 2005). Embora apresente papel de proteção contra microrganismos, uma disfunção na secreção desta citocina acarreta excessiva expressão de mediadores inflamatórios com dano tecidual e ativação de autoimunidade (KOLLS; LINDÉN, 2004).

As IL-17, como um todo, afetam a capacidade de diferenciação celular de culturas de células do ligamento periodontal em osteoblastos o que pode contribuir com a perda óssea alveolar na periodontite (ĐORĐEVIĆ et al., 2016). Além disso, estas citocinas foram capazes de promover osteoclastogênese por meio de aumento na expressão de RANKL em células tronco mesenquimais, o que pode favorecer reabsorção óssea tanto in vitro quanto in vivo (HUANG et al., 2009), sendo esta via uma das sugestivas para danos no periodonto promovidos pelas IL-17 (ZENOBIA; HAJISHENGALLIS, 2015).

Elevados níveis de IL-17 foram encontrados na saliva de pacientes com periodontite (AZMAN et al., 2014) e no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica fumantes e não fumantes submetidos ao tratamento inicial para a doença (BUDUNELI; BUDUNELI; KÜTÜKÇÜLER, 2009) em que tais níveis podem ser influenciados por outras citocinas como a IL-11 (AY et al., 2009). Além disso, a produção de IL-17 por células Th17 representam uma característica significativa para diferenciar lesões periodontais não destrutivas (inflamação gengival sem perda óssea) das lesões destrutivas (inflamação periodontal com reabsorção óssea) (THORBERT-MROS et al., 2019).

Análises genéticas demonstraram que a IL-17A é codificada por um gene localizado no cromossomo 6 (6p12.2) (WANG et al., 2012) e que polimorfismos no gene IL17A foram associados ao risco de desenvolvimento de nefrite decorrente de lúpus em crianças no Egito (HAMMAD et al., 2016). Dentre estes polimorfismos, dois – rs2275913 (uma mudança de adenina para guanina na posição -197 do gene da IL-17A) e

rs763780 (uma mudança de timina para citosina na posição -7488 do gene da IL-17F) – foram estudados com foco na sua associação com periodontite.

O primeiro estudo publicado sobre a relação entre estes polimorfismos e periodontite foi composto por 60 participantes de população brasileira (30 indivíduos saudáveis e 30 com periodontite crônica) e demonstrou que o alelo A no polimorfismo rs2275913 e o alelo T no polimorfismo rs763780 foram associados à doença e aos maiores valores de profundidade de sondagem (CORRÊA et al., 2012). Em contrapartida, em outro estudo posteriormente publicado também em brasileiros, o alelo A no polimorfismo rs2275913 esteve em maior frequência no grupo de pacientes saudáveis quando comparados aos pacientes com periodontite agressiva e crônica (SARAIVA et al., 2013).

Saraiva et al., (2013) utilizaram uma amostra composta por 72 indivíduos saudáveis comparados a 45 indivíduos com periodontite agressiva e 85 indivíduos com periodontite crônica. Estes resultados divergem dos achados de um posterior estudo sobre a associação entre este polimorfismo no gene da IL-17A e periodontite, o qual o alelo A esteve significativamente associado aos pacientes com periodontite crônica (*Odds Ratio* = 1,59, $P = 0,04$) (ZACARIAS et al., 2015).

Corroborando os achados de Zacarias et al. (2015), Chaudhari et al., (2016) encontrou significativa associação entre o alelo A e o risco de desenvolvimento tanto de periodontite agressiva (na forma localizada) quanto crônica. Este estudo envolvendo 70 pacientes de ambos os sexos e portadores de periodontite (35 com periodontite agressiva e 35 com periodontite crônica) e 35 controles saudáveis encontrou elevado valor de associação quando comparou-se os alelos A versus G entre os pacientes com periodontite agressiva e saudáveis (*Odds Ratio* = 5,1, $P < 0,05$) e entre os pacientes com a forma crônica da doença e saudáveis (*Odds Ratio* = 5,1, $P < 0,05$).

Porém, dados conflitantes persistem sobre a associação deste polimorfismo com a periodontite. Vahabi et al. (2018) não identificaram associação significativa entre o polimorfismo rs2275913 no gene IL17A e o risco de periodontite crônica em Iranianos ($P = 0,54$) ao passo que um posterior estudo demonstrou associação significativa entre o genótipo mutado neste polimorfismo e pacientes com avançados estágios de periodontite (ABDELKAWY; ABDELFATTAH; SHAKER, 2019).

Uma metanálise publicada por Silva et al. (2018) sintetizou os dados disponíveis sobre este polimorfismo no gene IL17A e o risco de periodontite. Com base em 5 estudos caso/controle, os autores demonstraram que o genótipo selvagem

representou um fator de proteção estando associado ao grupo controle tanto para a periodontite crônica (*Odds Ratio* = 0,58, *P* = 0,01) quanto agressiva (*Odds Ratio* = 0,40, *P* = 0,04) e o genótipo mutado esteve significativamente associado aos pacientes com periodontite crônica (*Odds Ratio* = 1,73, *P* = 0,01) e agressiva (*Odds Ratio* = 2,73, *P* = 0,04).

Os dados de Silva et al. (2018) são acurados pela não detecção de viés de publicação, além de ser a primeira metanálise focando em polimorfismos nas interleucinas da família 17 e sua relação com as diferentes formas clínicas da periodontite. Porém, mesmo com o robusto método empregado nesta metanálise, os dados dos autores podem sofrer outros viés e representarem achados falso-positivos. Portanto uma abordagem Bayesiana validando os dados desta metanálise é requerida para atestar a real associação entre o polimorfismo rs2275913 no gene IL17A e o risco de periodontite.

2.1.9 Interleucina 18

A IL-18 é um membro da grande família das IL-1 identificada inicialmente como um fator indutor de INF- γ atuando no sistema imune pela produção deste mediador pelas células Th1 e *Natural Killers* (NK) com aumento da citotoxicidade destas células (ZHOU et al., 2016). Esta IL atua em sinergismo com a IL-12 na ativação e indução da proliferação de células Th1 (NAKANISHI et al., 2001) o qual sua função não está limitada somente às células NK e linfócitos Th1, sem a ação de mediadores complementares, a IL-18 induz a produção de citocinas associadas às células Th2 (KAWAYAMA et al., 2012).

Similar às IL-1 α e IL-33, o precursor da IL-18, composto por 193 aminoácidos sintetizado primariamente como um precursor inativo de 24 kDa sem peptídeo sinal, que se acumula no citoplasma celular (WEI et al., 2014), é constitutivamente expresso em células endoteliais células, queratinócitos ou células epiteliais intestinais em todo o trato gastrointestinal (NOVICK et al., 2013). Em contraste com a IL-1 β , o precursor da IL-18 está presente constitutivamente em monócitos, macrófagos e células dendríticas de indivíduos saudáveis (DINARELLO et al., 2013), mas semelhante à IL-1 β o precursor da IL-18 é processado intracelularmente pela caspase 1 em sua molécula biologicamente madura de 18 kDa (WAWROCKI et al., 2016).

O gene responsável pela expressão da IL-18 está localizado no cromossomo 11 em humanos na região 11q22.2-q22.3 e compreende seis éxons e cinco íntrons com o

comprimento de 19,5 kb (GEIDRAITIS et al., 2001). Diferentemente de outros genes de citocinas, o gene da IL-18 possui poucos elementos desestabilizadores do RNA, resultando em uma expressão de citocinas incomumente estável em que a transcrição do precursor de IL-18 pode ser induzida após ligação de PAMP's e ativação da via NF- κ B (KAPLANSKI et al., 2018).

O gene IL18 humano contém cerca de 91 *loci* polimórficos dentro de uma região de 23 kb incluindo a região promotora proximal e 500 bp à jusante do gene (THOMPSON; HUMPHRIES, 2007). Variações genéticas que possam interferir no *splicing* alternativo do RNAm da IL-18 ainda não foram identificadas, contudo existem polimorfismos dentro da extremidade não transcrita 5' e 3' e também na região promotora que podem ou causar instabilidade no transcrito primário ou alterar a taxa de transcrição do gene (LIANG et al., 2005).

Existem poucos estudos na literatura que avaliaram a relação entre polimorfismos no gene IL18 e os níveis plasmáticos da IL-18 em que foram identificadas associações significativas entre o polimorfismo +105 A/C e o risco de asma, por exemplo, mas sem associação com os níveis de IL-18 (HIGA et al., 2003). Por outro lado, *in vitro*, culturas de monócitos de voluntários saudáveis com o genótipo AA mostrou maior aumento na produção de IL-18 que o genótipo heterozigoto quando estimulados por LPS (ARIMITSU et al., 2006).

Este estudo também avaliou o polimorfismo -137 G/C e encontrou resultados divergentes dos dados sobre o polimorfismo +105 A/C. O genótipo homozigoto selvagem para o polimorfismo -137 G/C foi significativamente associado à maior produção de IL-18 pelas células do que o genótipo CC ou GC ($P < 0,05$). Corroborando este achado a maior expressão de IL-18 em culturas de monócitos, extraídos de voluntários saudáveis, estimulados por LPS e positivos para o alelo selvagem deste polimorfismo foi identificada em estudo posterior (PAVLOVNA et al., 2008).

LPS oriundo de um bem estabelecido periodontopatógeno, a espécie *P. gingivalis*, promoveu aumento na expressão de IL-18 em culturas de monócitos (BARKSBY et al., 2009), demonstrando a potencial influência que, também, bactérias na região periodontal responsáveis pela iniciação da periodontite tem sobre os níveis de IL-18. Seja por influência genética, seja pela estimulação da resposta imune por periodontopatógenos, os níveis de IL-18 foram aumentados em pacientes com periodontite quando comparados a pacientes com gengivite (OROZCO et al., 2006).

Outros estudos também avaliaram os níveis de IL-18 em pacientes com periodontite (SANCHEZ-HERNANDEZ et al., 2011; WEI et al., 2008) os quais foram alvo de uma metanálise que sintetizou os dados sobre polimorfismos no gene IL18, níveis de IL-18 e o risco de periodontite (LI et al., 2014). Nesta metanálise 6 estudos caso/controle foram inclusos sobre o polimorfismo -607 A/C e o polimorfismo -137 G/C em que, após a avaliação estatística, foi observado valor significativo de associação entre estes polimorfismos e o risco da doença quando comparou-se os alelos mutados de ambos os polimorfismos com os alelos selvagens ($P = 0,001$ e $P = 0,004$, respectivamente).

Uma das limitações citadas por Li et al. (2014) foi o número reduzido de estudos caso/controle para a avaliação destes polimorfismos e a periodontite. Embora valores significativos de associação tenham sido observados, o risco deste dado ser falso-positivo é elevado, e portanto, os dados apresentados nesta metanálise devem ser interpretados com cautela. Uma abordagem bayesiana acerca dos achados de Li et al. (2014) é requerida para validação dos resultados publicados pelos autores.

2.1.10 Gene ANRIL

Sabe-se que a periodontite é uma doença inflamatória resultado da consequente indução transcricional do sistema imune por estímulos externos, como a presença de bactérias nas bolsas periodontais, e ativação de cascatas moleculares com ligação de fatores de transcrição nas regiões promotoras de genes de mediadores inflamatórios (SMALE, 2012). A nível gênico, mutações, polimorfismos ou alterações na sequência dos promotores dos genes afetam não somente a iniciação da expressão do gene como também o nível desta expressão com síntese incorreta da sequência de aminoácidos da proteína e possível perda de sua função (SHASTRY et al., 2009).

Este é o modelo básico das possíveis interferências genéticas sobre a resposta imune não somente da periodontite, mas em outras doenças inflamatórias (LARSSON; CASTILHO; GIANNOBILE, 2015). Uma outra via de regulação da resposta imune se dá por meio de mecanismos que não envolvem diretamente mudanças em bases nitrogenadas e consequente alteração na sequência de DNA e são conhecidos como mecanismos epigenéticos representados por eventos complexos mas potencialmente reversíveis com processos de metilação do DNA ou modificação de histonas (BARROS; OFFENBACHER, 2014; GOMES; DUTRA; MOREIRA, 2009; LUO et al., 2018).

Além destes, tem-se outro evento epigenético conhecido pela ação de moléculas regulatórias como os longos RNA's não codificadores (do inglês *long non-coding RNA's* – lncRNA's) (CARPENTER et al., 2014) sugestivos de estarem envolvidos desde a patogênese de condições inflamatórias à carcinogênese pela modificação de histonas (BOCHENEK et al., 2013; TAHERI et al., 2017). O RNA não codificador antisense INK4 (ANRIL) é um desses lncRNA's, identificado como uma molécula candidata à periodontite (SCHAEFER, 2018). O ANRIL regula a expressão de múltiplos genes por mecanismos *cis* e *trans*, interagindo com as metiltransferases de DNA e outras proteínas específicas (AARABI et al., 2018) fazendo parte do *locus* CDKN2A/B localizado na região 9p21.3 (MCPHERSON et al., 2007).

O ANRIL apresentou contribuição considerável para o aumento risco de câncer (GAMEL et al., 2017) e atraiu bastante enfoque nos últimos anos. Uma recente meta-análise identificou que a alta expressão de ANRIL estava significativamente associada ao estágio avançado do câncer humano (WANG et al., 2018). Por outro lado, outra metanálise composta por 12.005 participantes trouxe associação significativa entre uma variante (o polimorfismo rs4977574) no gene ANRIL e o risco de doença arterial coronariana (XU et al., 2018).

O primeiro estudo com o objetivo de determinar a interação entre polimorfismos no gene ANRIL e a periodontite foi realizado por Schaefer et al., (2009) que encontraram associações significativas entre dois polimorfismos (rs1333042 e rs1333048) e o risco da forma agressiva generalizada da doença. Um estudo posterior em população chinesa, por sua vez não encontrou associação significativa entre esses polimorfismos e o risco de desenvolvimento da periodontite (CHEN et al., 2012).

A literatura traz outros dados importantes sobre SNP's no gene ANRIL e periodontite (ERNST et al., 2010; SCHAEFER et al., 2011) demonstrando a ação destes fatores no risco da doença. Além disso, houve uma significativa regulação positiva do gene ANRIL na progressão do osteossarcoma (YU et al., 2018) representando o papel do ANRIL na biologia óssea e possivelmente na periodontite. No entanto, os resultados permanecem contraditórios.

Esses achados conflitantes nos estudos genéticos podem representar um desafio para a pesquisa e vista a falta de um estudo que reúna tais achados dá-se necessário um este estudo de meta-análise abordando os resultados sobre o polimorfismo rs1333048 no gene ANRIL e periodontite. Tal estudo pode trazer uma melhor avaliação

dos dados acerca da influência desta variação genética e o risco de desenvolvimento da doença.

2.1.11 Metanálise em estudos genéticos

A identificação de correlações genéticas entre características complexas e doenças pode fornecer informações etiológicas úteis e ajudar a priorizar possíveis relações causais (BULIK-SULLIVAN et al., 2015). Embora diversos estudos usando metodologias de determinação de frequência alélica e genotípica por reação em cadeia da polimerase (PCR) (BOUKORTT et al., 2015; CORRÊA et al., 2012) ou associação genômica (DIVARIS et al., 2013) tem buscado esclarecer a relação entre polimorfismos em citocinas ou outros mediadores inflamatórios e periodontite, os resultados mostraram-se falhos pelo número amostral reduzido gerando dados falso-positivos ou falso-negativos (CARINCI et al., 2015). Um dos principais desafios que impedem a estimativa da correlação genética a partir dos dados do estudo de associação genômica com os métodos atuais são a falta de disponibilidade de dados genotípicos no nível individual para variantes gênicas raras (AUER; LETTRE, 2015).

Apesar de a PCR ser uma ferramenta molecular amplamente utilizada em diversos campos da odontologia (MAHEASWARI; KSHIRSAGAR; LAVANYA, 2016), existem limitações, especialmente referentes ao tamanho amostral, que podem inviabilizar o desenvolvimento deste tipo de estudo (IOANNIDIS; TRIKALINOS; KHOURY, 2006). Nessa perspectiva os estudos de metanálise têm sido cada vez mais empregados em análise genética pela sua maior capacidade de associação de dados (COHN; BECKER, 2003) anulando os chamados "efeitos curtos" que estudos com número amostral reduzido acarretam (LOHMUELLER et al., 2003).

A metanálise é uma ferramenta estatística utilizada para agregar resultados de estudos tornando-se comum e com crescente interesse, especialmente no campo de estudos em genética humana, devido à dificuldade existente em se obter resultados robustos, confiáveis e replicáveis nestes tipos de estudos (MUNAFÒ; FLINT, 2004). Quando o tamanho amostral é elevado (em cerca de centenas de participantes) mesmo alelos raros podem ser identificados com sucesso (AUER; LEAL, 2017; CHELLY; MANDEL, 2002). Contudo para muitos estudos de associação, a incapacidade em fornecer evidências convincentes – como valores de *Odds Ratio* (OR) maiores que 1,5 para um polimorfismo associado ao câncer de mama (PHAROAH et al., 2002), por

exemplo – indica falhas metodológicas associadas ao tamanho amostral que podem ser anuladas pela metanálise.

A informação principal obtida por meio de metanálise em estudos de polimorfismos genéticos é o valor de *Odds Ratio* usado para quantificar a associação de dados. O cálculo de OR neste tipo de metanálise pode ser obtido por meio do modelo de efeito-fixado (MANTEL; HAENSZEL, 1956), modelo estatístico mais confiável por assumir variação mínima entre os estudos ou do modelo de efeitos aleatórios (DERSIMONIAN; LAIRD, 1986), modelo estatístico menos confiável por assumir variados pesos entre os estudos com maior divergência estatística (DERSIMONIAN; LAIRD, 2015; KAVVOURA; IOANNIDIS, 2008).

Contudo, outros cálculos adicionais fornecem dados relevantes à metanálise. Por exemplo, tem-se o valor de heterogeneidade estatística que define a variação estatística entre os estudos por meio do cálculo do teste do qui-quadrado baseado no teste Q de Cochran (I^2) (HIGGINS et al., 2002) influenciando diretamente no modelo estatístico aplicado aos dados (HUEDO-MEDINA et al., 2006). Além desse cálculo, tem-se os valores de viés de publicação (caracterizados como erros na busca sistemática dos estudos que comporão a metanálise os quais podem invalidar os resultados) sendo obtido pelos testes de regressão linear de *Egger* (EGGER et al., 1997) e pelo teste de *Begg* (BEGG; MAZUMDAR, 1994).

Metanálises com foco em polimorfismos em genes de mediadores inflamatórios estão disponíveis na literatura trazendo informações esclarecedoras sobre a associação destas alterações genéticas e o risco da doença (SILVA et al., 2017; SHAO et al., 2009; YAN et al., 2014). Percebe-se portanto a maior confiabilidade e acurácia de resultados devido a elevada capacidade de associação de dados feita pela metanálise. Esta associação vem a permitir o correto direcionamento do enfoque no desenvolvimento de marcadores moleculares para a doença destacando assim a importância do desenvolvimento deste tipo de estudo em análise genética.

2.1.12 Abordagem Bayesiana em metanálises de estudos genéticos

Revisões sistemáticas e meta-análises em avaliações genéticas são uma fonte de dados confiáveis pela combinação dos resultados disponíveis na literatura trazendo novos achados robustos e acurados (MUNAFÓ E FLINT, 2004). Especificamente, a metanálise é relevante para detectar quaisquer efeitos individuais por aumento do poder de associação e tem sido usada no teste de nível genético para associação de

variantes raras (LIU et al., 2014) ou associação genômica (EVANGELOU; IOANNIDIS et al., 2013).

No entanto, a metanálise tem uma limitação importante representada pelo que alguns autores chamam de taxa de falso positivo e propõe métodos estatísticos para resolver esse problema (MAJUMDAR et al., 2018). Esta limitação é referente ao valor P como limiar de confiabilidade que pode ser apontado como uma potencial falha na interpretação de uma metanálise. Quando os autores e leitores consideram o valor P, isoladamente, como o único ponto de precisão, vários dados podem se tornar falsos-positivos devido à limitação estatística que influencia o valor P e, portanto, esse índice possivelmente não seja confiável como a comunidade científica considera (NUZZO, 2014).

De fato, um achado estatístico significativo não depende apenas do valor significativo de P, mas também da prévia probabilidade de que a associação entre o polimorfismo genético e a alteração fenotípica seja real e do poder estatístico do teste aplicado (WACHOLDER, 2004). Para verificar os possíveis dados de taxa de falsos positivos em metanálises e associações genômicas, foram desenvolvidos os cálculos bayesianos específicos denominados FRPR (*False-Positive Report Probability*) e BDFP (*Bayesian False Discovery Probability*) (ROUDE et al., 2019; SUTTON; ABRAMS, 2001).

Primeiramente, o teste FRPR avalia a probabilidade de uma associação não verdadeira entre o fator e a doença (WACHOLDER et al., 2004) e foi introduzido como meio de avaliar se a força de associação era “digna de nota” e como critério de verificação para leitores e autores se certificarem da possível interpretação superestimada de dados significativos que provavelmente não refletem uma associação verdadeira (COLQUHOUN, 2014; EFRON et al., 2007). Após o desenvolvimento do teste FRPR, observou-se uma maior preocupação com a taxa de dados falso-positivos que culminou com o desenvolvimento do teste BDFP (WAKEFIELD, 2007) que difere do teste FRPR pelo uso de variáveis fixas permitindo que a taxa de falsas descobertas sejam controladas (WHITTEMORE, 2007).

Ambos os testes diferem dos chamados métodos frequentistas que se valem invariavelmente do valor significativo de P tornando-se testes com análises mais diretas, intuitivas e informativas (KRUSCHKE; LIDDELL, 2018). Neste contexto, um estudo de abordagem bayesiana com enfoque nas metanálises disponíveis acerca de polimorfismos genéticos em mediadores inflamatórios e periodontite dá-se necessário

para validação dos achados observados e direcionamento em futuras pesquisas que foquem no desenvolvimento de marcadores moleculares para esta patologia.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar por meio de cálculos meta-analíticos a relação entre os polimorfismos -330 T/G no gene IL2 e rs1333048 no gene ANRIL com o risco de desenvolvimento de periodontite crônica e revalidar os dados de metanálises publicadas sobre polimorfismos em interleucinas e periodontite crônica por abordagem bayesiana.

2.2.2 Objetivos específicos

Calcular o valor de associação entre os polimorfismos -330 T/G no gene IL2 e rs1333048 no gene ANRIL e o risco de desenvolvimento de periodontite crônica em indivíduos de diferentes populações;

Calcular o valor de heterogeneidade para os estudos que abordem os polimorfismos -330 T/G no gene IL2 e rs1333048 no gene ANRIL e o risco de desenvolvimento de periodontite;

Determinar a existência de possível viés de publicação sobre os estudos acerca do polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e do polimorfismo rs1333048 no gene ANRIL e o risco de desenvolvimento de periodontite crônica;

Verificar a veracidade das evidências disponíveis nas metanálises coletadas sobre diferentes polimorfismos em variadas interleucinas e o risco de desenvolvimento de periodontite crônica;

Calcular a taxa de relatos falsos-positivos acerca das metanálises disponíveis sobre variantes genéticas em interleucinas e o risco de periodontite crônica;

Determinar a qualidade dos estudos inclusos na metanálise de abordagem bayesiana por meio de critério de qualidade metodológico específico;

Montar uma rede de interação gênica e proteica sobre as interleucinas inclusas no estudo de abordagem bayesiana.

3 CAPÍTULO II

3.1 Artigo 1

Associação não significativa entre o polimorfismo -330 T/G no gene da interleucina-2 e periodontite crônica: achados de uma metanálise

Felipe Rodolfo Pereira da Silva^{1,3}, Juliana Gomes Galeno², Alessandro Luiz Araújo Bentes Leal³, Reyce Santos Koga³, Nayana Yared Batista¹, Silvânia da Conceição Furtado³, Daniel Fernando Pereira Vasconcelos², Marcelo Diniz Carvalho⁴, José Fernando Marques Barcellos^{1,3}.

¹ Aluno de Doutorado no Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas;

² Laboratório de Análise e Processamento Histológico (LAPHIS), Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil;

³ Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas;

⁴ Departamento de Periodontia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas;

Autor correspondente: Felipe Rodolfo Pereira da Silva

Email: feliperodolfo.15@hotmail.com.

Endereço postal: Departamento de Morfologia, Avenida General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado, Manaus, Amazonas, CEP: 69067-005. Número de telefone: +5592992873755.

ORCID ID: 0000-0001-9224-5571.

Resumo

Background: Periodontite crônica (CP) é uma doença imune que promove danos aos tecidos ao redor dos dentes. Dentre os diversos mediadores inflamatórios que orquestram a periodontite, tem-se a interleucina-2 (IL-2). Variações genéticas no gene IL2 podem ser associadas com o risco e severidade da doença. Resultados contraditórios estão disponíveis na literatura com achados inconclusivos e nenhuma metanálise que reúna esses dados.

Métodos: Uma busca na literatura foi realizada para estudos publicados antes de 11 de Junho de 2019 em diversas bases de dados científicas e educacionais. Os dados foram extraídos por dois investigadores e a avaliação estatística foi feita por meio do programa estatístico Review Manager com cálculos de heterogeneidade (I^2) e *Odds Ratio* (OR) com 95% de intervalo de confiança (IC), e também uma análise sensível foi realizada para determinar a acurácia dos resultados obtidos. O viés de publicação foi avaliado pelos testes de *Begg* e *Egger* com o *software Comprehensive meta-analysis*. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados: Cinco estudos foram identificados em diversos grupos étnicos com 1.425 participantes. O polimorfismo -330 T/G no gene IL2 teve uma associação não significativa com o risco de CP na avaliação alélica ($P > 0,05$). Não foram observadas associações significativas também na avaliação genotípica ($P = 0,15$). Os testes de *Begg* e *Egger* não mostraram nenhuma evidência de viés de publicação ($P > 0,05$) o que foi corroborado com a ausência de assimetria no gráfico de *Funnel plot*.

Conclusões: Esta metanálise mostrou uma não associação significativa entre o polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e CP em nenhuma das avaliações calculadas.

Palavras-chave: Doença periodontal; Citocina; *Odds Ratio*; Fator de risco; Alelos.

Background

A periodontite é caracterizada como uma condição clínica causada pelo acúmulo de placa dental no periodonto e resposta imune do hospedeiro com dano tecidual resultando em possível perda dental (KNIGHT et al., 2016). A doença atingiu significativa prevalência mundial em que 10% da população ao redor do mundo foi afetada pela forma severa da doença (FRENCKEN et al., 2017). Além disso, na Noruega, 49,5% de 1.911 pacientes tiveram periodontite (HOLDE et al., 2017) o qual a doença afetou 64,7 milhões de pessoas nos Estados Unidos entre 2009 e 2014 (EKE et al., 2015) e teve elevada prevalência na Itália (AIMETTI et al., 2015) e em Brasileiros (SUSIN; HAAS; ALBANDAR, 2014).

A doença recebe distintas classificações, em que as formas crônica e agressiva (CP e AgP, respectivamente) são as mais comuns na clínica o qual a CP é caracterizada pela sutil e lenta progressão atingindo pessoas com maior média de idade (LÓPEZ; BAELUM, 2015).

Diversos fatores estão envolvidos no desenvolvimento e progressão da periodontite desde a falta de higiene oral (LETPIMONCHAI et al., 2017) a específicas espécies bacterianas na região subgengival (COSTALONGA et al., 2014) ou mesmo fatores genéticos em mediadores inflamatórios (SAJADI et al., 2018; SILVA et al., 2016). Dentre as diversas moléculas envolvidas na resposta imune do hospedeiro durante infecções ou inflamações tem-se a interleucina 2 (IL-2). Esta citocina está envolvida tanto na indução quanto finalização da resposta imune (HOYER et al., 2008) em que a IL-2 pode promover a supressão da inflamação pela regulação de células T (LAN et al., 2008). De fato, a terapia com baixas doses de IL-2 ou sua forma recombinante foi observada como uma abordagem efetiva contra condições autoimunes ou doenças inflamatórias (KLATZMANN; ABBAS, 2015) bem como a supressão de crescimento tumoral e câncer de pâncreas (WANG et al., 2013).

Em relação a IL-2 e periodontite, existem dados contraditórios na literatura acerca da associação entre o aumento nos níveis de IL-2 e a doença. Alguns autores mostram significativos maiores níveis desta citocina no fluido gengival de pacientes com periodontite em relação aos controles saudáveis (GÓSKA et al., 2003). Contudo, outros autores encontraram resultados divergentes (CHEN et al., 2015).

Estes achados contraditórios também foram observados em avaliações genéticas. O gene IL2 está localizado no cromossomo 4 na região 4q26-4q27 em que polimorfismos neste gene foram primeiro descritos por Jonh et al. (1998) representados

por dois polimorfismos de nas regiões -330 e -384 no promotor do gene, consequentemente afetando a expressão da IL-2. O primeiro estudo focando em variações genéticas dentro do gene IL2 e periodontite foi publicado em 2002 por Scarel-Caminaga et al. (2002) o qual seu próprio estudo apresentou resultados divergentes. Primeiramente, os autores não identificaram uma associação significativa entre o polimorfismo -330 T/G e a periodontite ($P > 0,05$), a relação significativa apenas foi observada quando o grupo controle foi combinado com o grupo diagnosticado com periodontite moderada. Assim, o polimorfismo foi associado à forma severa da doença. Igualmente, Li et al. (2012) identificaram significativa associação entre esta variante genética e a periodontite tanto nas avaliações alélicas quanto genotípicas. Entretanto, após teste de regressão logística, o polimorfismo não foi associado com a periodontite.

Achados contraditórios em estudos genéticos podem representar um desafio para a pesquisa e vista a ausência de um estudo que possa reunir estes achados, este trabalho objetivou realizar uma metanálise abordando os resultados acerca do polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e CP.

Materiais e métodos

Para realizar esta metanálise, o protocolo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses*) foi seguido (MOHER et al., 2009).

Crítérios de escolha

Para serem inclusos nesta metanálise, os artigos deveriam trazer estudos que se enquadrassem em todos os seguintes critérios: (1) Avaliação do polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e periodontite em humanos; (2) Estudos serem do tipo caso/controle; (3) Os pacientes do grupo caso terem recebido diagnóstico confirmatório de CP por achados clínicos e radiográficos como previamente descrito (PAGE; EKE, 2007) e os controles terem apresentado avaliação clínica periodontal saudável; (4) Frequências genotípicas documentadas; (5) Os participantes inclusos dentro das avaliações genotípicas e alélicas não tivessem apresentado gravidez ou desordens sistêmicas (diabetes ou doenças autoimunes).

Estratégia de busca

Dois investigadores independentes realização a busca sistemática na literatura para estudos que analisaram a possível associação entre o polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e o risco de periodontite em humanos. As bases de dados usadas foram as seguintes: China *DATABASE*, *Google Scholar*, *PubMed*, e *Web of Science*. Os autores

usaram a combinação das seguintes palavras-chave e descritores em saúde (DeCS): (*interleukin* ou *cytokine* ou *interleukin 2* ou IL2) e (*genetic variation* ou rs2069762 ou *polymorphism* ou -330 T/G *polymorphism*) e (*periodontitis* ou *periodontal disease* ou *chronic periodontitis*). Não foram aplicadas restrições de linguagem na busca sistemática que abordou estudos publicados anteriormente a 11 de Junho de 2019. Os resumos dos estudos foram analisados e as referências avaliadas para a possível identificação de potenciais estudos adicionais.

Coleta dos dados

Dois autores independentemente revisaram todos os estudos identificados na busca sistemática e extraíram os dados seguindo um formulário padronizado que iria compor a tabela de características dos estudos inclusos. Com o objetivo de medir a qualidade metodológica dos estudos, o protocolo para revisões sistemáticas de estudos de associação genética em periodontia proposto por Nibali (2013) foi usado, estudos que obtiveram pontuação menor que 10 escores foram excluídos.

Análise estatística

O *software* estatístico *Review Manager* versão 5.3 (RevMan, *Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, 2012*) para revisões sistemáticas e metanálises foi usado nos cálculos. Por sua vez, o viés de publicação foi avaliado pelo *software* estatístico *Comprehensive Meta-analysis* versão 3.3.070 (2014), disponível para treino.

A presença ou ausência de heterogeneidade (I^2), foi calculada pelo teste do qui-quadrado baseado no teste estatístico Q e analisada pelo gráfico de *Funnel-plot* para heterogeneidade. Quando o valor observado de I^2 não foi estatisticamente significativo ($I^2 < 50\%$, $P > 0,05$), os autores usaram o modelo de efeitos fixos para cálculo do *Odds Ratio* (OR) agrupado. Quando I^2 apresentou significância estatística ($I^2 > 50\%$, $P < 0,05$), o modelo de efeitos aleatórios foi usado para o cálculo de OR. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Para determinar a exata influência da variação genética nos cálculos da metanálise, seis modelos genéticos foram calculados tomando como base “M” como alelo mutado e “m” como alelo selvagem. Assim, obtiveram-se comparações alélicas: (I) M versus m, (II) m versus M; comparações genotípicas: (III) MM versus mm, (IV) mm versus MM; E a combinação entre as variações genotípicas: (V) MM versus mm + Mm e (VI) Mm versus mm + MM. O teste de *Begg* e o teste de regressão linear de *Egger* (com valor de $P < 0,05$) foram as análises estatísticas usadas para determinar potencial viés de publicação na metanálise, a assimetria no gráfico de *Funnel-plot* para

viés de publicação também foi considerado. Em complemento, os autores realizaram uma análise sensitiva para avaliar a robustez dos resultados agrupados. Houve a omissão de cada estudo inclusos por vez para detectar efeitos individuais nas análises gerais. Todos os dados inclusos foram dados dicotômicos expressos por meio de OR com 95% de intervalo de confiança (CI) para determinar a possível associação entre o polimorfismo no gene IL2 e periodontite.

Resultados

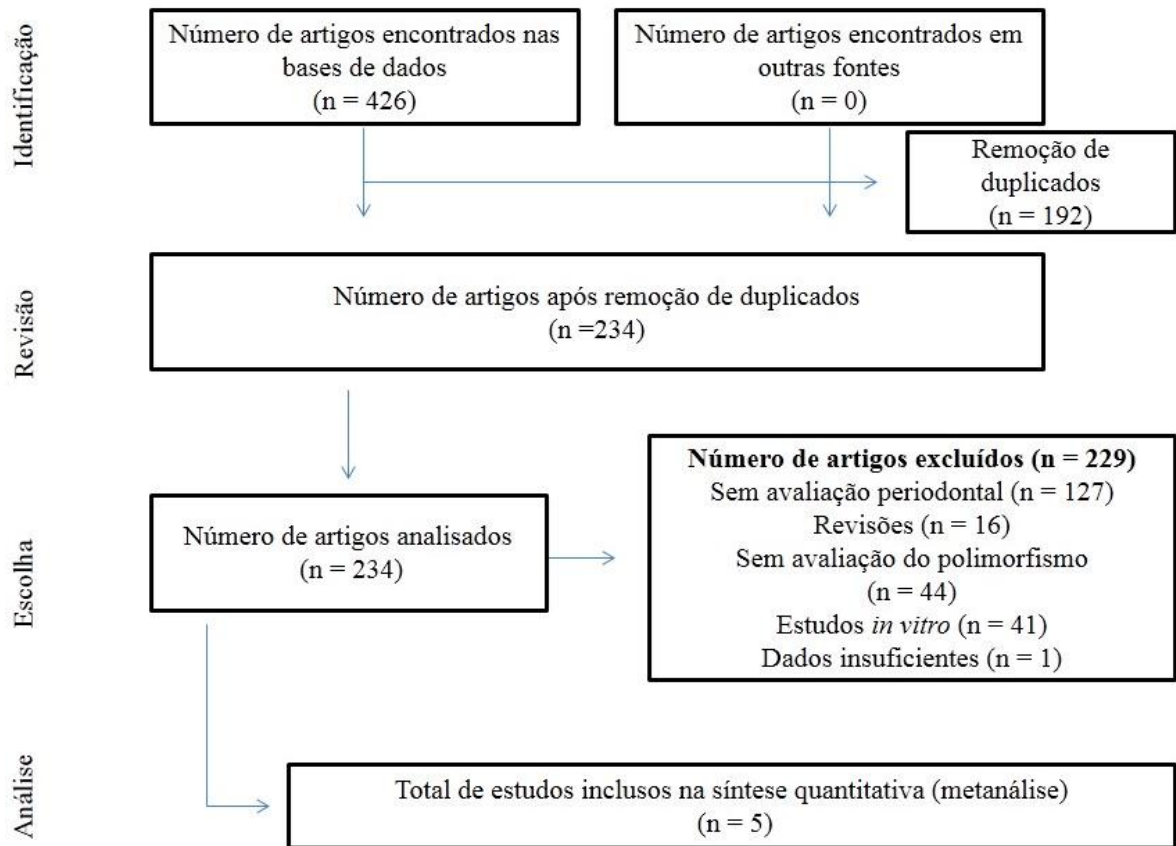
Características dos estudos inclusos

Ao final da busca sistemática, cinco artigos (LI et al., 2012; MAJUMDER et al., 2019; REICHERT et al., 2009; SCAREL-CAMINAGA et al., 2002; VAHABI et al., 2018) publicados entre 2002 e 2019 estiveram de acordo com os critérios de inclusão e portanto foram inclusos na metanálise (Figura 1). Os estudos foram realizados em três diferentes grupos étnicos: Caucasianos (REICHERT et al., 2009; VAHABI et al., 2018), Asiáticos (LI et al., 2012; MAJUMDER et al., 2019) e população miscigenada (SCAREL-CAMINAGA et al., 2002). Um artigo (SCAREL-CAMINAGA et al., 2002) dividiu o grupo caso em duas variações da forma crônica da periodontite: formas moderada (I) e severa (II), mais detalhes estão disponíveis na tabela 1. Visto estes dados, esta metanálise é composta por diversos estudos em 1.425 participantes (505 casos e 920 controles saudáveis).

Metanálise

O cálculo da metanálise mostrou uma associação não significativa entre o polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e o risco de CP em toda a avaliação alélica (Figura 2). Também, nenhuma associação significativa foi obtida nas comparações genotípicas em que nem o genótipo homozigoto mutado foi associado ao risco da doença (OR=2,07, 95% IC: 0,76, 5,61, P=0,15) nem o selvagem associado aos controles (OR=0,48, 95% IC: 0,18, 1,39, P=0,15). Todos os cálculos foram realizados por meio do modelo de efeitos aleatórios devido elevada I² (Tabela 2), exceto para o grupo Caucásiano em que os cálculos foram obtidos pelo modelo estatístico de efeito-fixo. Uma análise estratificada por etnia foi realizada e mostrada na tabela 2.

Figura 1 – Fluxograma de identificação, revisão, escolha e análise dos estudos inclusos nesta recente metanálise



Fonte: Próprio autor

Tabela 1 – Características dos estudos inclusos nesta metanálise

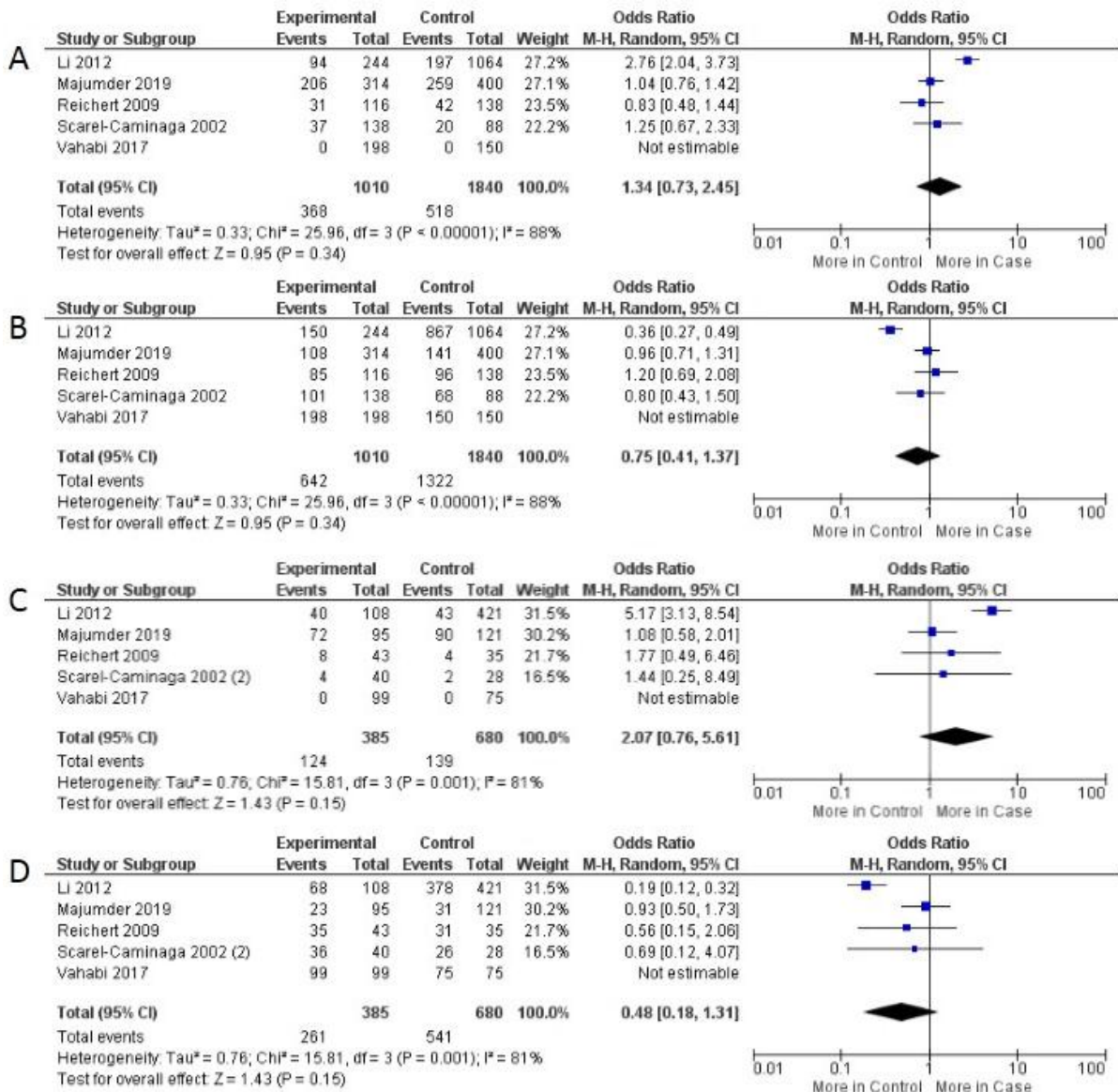
Autor	Ano	País	Etnia	N amostral (Cc/Co)
Li	2012	China	Asiáticos	122/532
Majumder	2019	Índia	Asiáticos	157/200
Reichert	2009	Alemanha	Caucasianos	58/69
Scarel-Caminaga	2002	Brasil	Miscigenados	69/44
Vahabi	2017	Irã	Caucasianos	99/75

Autor	Ano	Frequência genotípica (Cc- GG,TG,TT/ Co- GG,TG,TT)	Idade (Cc/Co)	Score/EHW (X ² , P)
Li	2012	40,14,68/ 43,111,378	38-69	14/Não (X ² >3,84, P<0,05)
Majumder	2019	72,62,23/90,79,31	41,59±11,12/38,41±9,48	14/Sim (X ² <3,84, P>0,05)
Reichert	2009	8,15,35/ 16,51,64	49,1±9,6/46,7±10,7	14/Não (NI)
Scarel-Caminaga	2002	4,29,36/ 2,16,26	36,9±11,2(I)-43,6±14,4(II)/ 43,2±14,0	14/NI
Vahabi	2017	0,0,99/ 0,0,75	40,28±12,73/31,67±1,00	12/NI

Legenda – Cc-Casos; Co-Controles, EHW-Equilíbrio de Hardy-Weinberg, NI-Não informado.

Fonte: Próprio autor

Figura 2 – *Forest plot* de comparação entre o polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e o risco de CP (A) no alelo mutado versus selvagem in mutante, (B) no alelo selvagem versus o mutado, (C) no genótipo homocigoto mutado versus o selvagem, (D) no genótipo homocigoto selvagem versus mutado.



Fonte: Próprio autor

Análise sensítiva e viés de publicação

O efeito individual dos estudos foi determinado pela análise sensítiva. Cada estudo foi omitido por vez para determinar o possível impacto no valor de OR agrupado. Nenhum estudo mudou o valor de OR agrupado, quantitativamente. Esse achado sugeriu que os resultados desta metanálise são acurados. Nenhum viés de publicação foi determinado nesta metanálise como demonstrado pelos testes de *Begg* e *Egger* na avaliação alélica sobre o polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e CP (P=0,69 e P=0,43, respectivamente). Em complemento, nenhuma assimetria no gráfico de *Funnel plot* para viés de publicação foi encontrada validando os testes realizados (Figura 3).

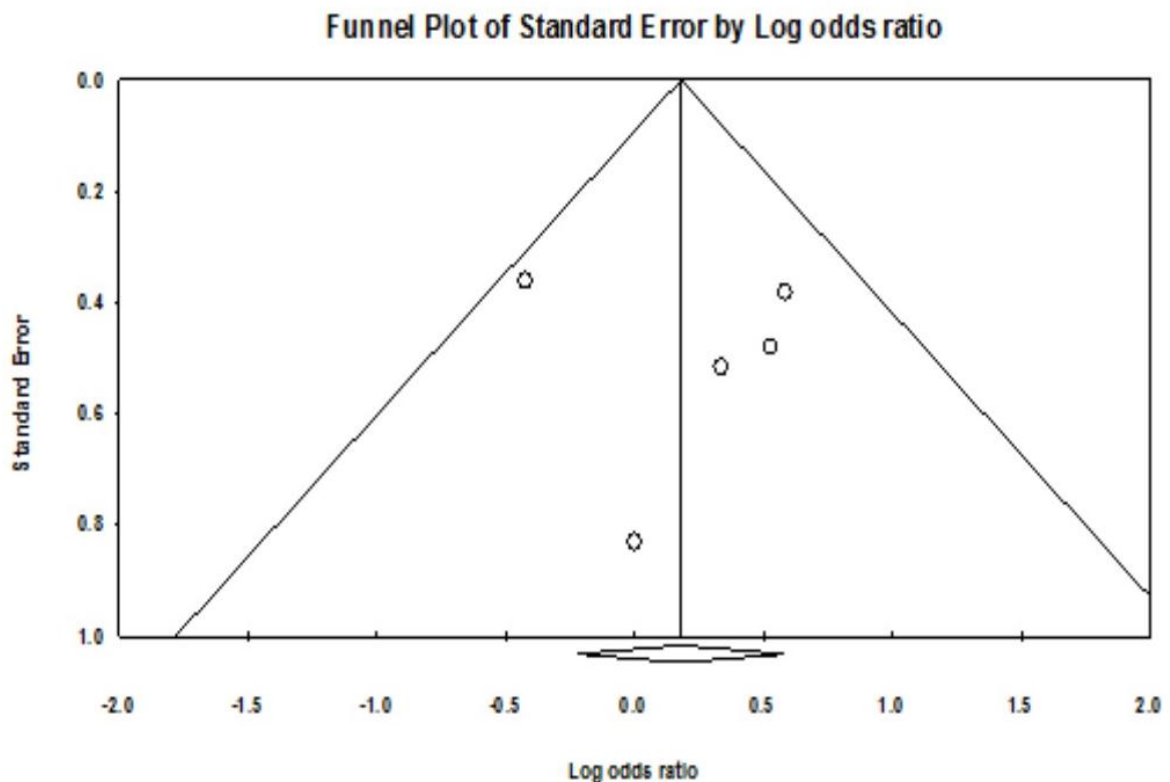
Tabela 2. Metanálise de comparação para o polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e risco de periodontite crônica (comparações alélicas e genóticas)

Comparação (n)	OR (95% IC)	P (Teste Z)	I ²	Pheterogeneidade	Modelo usado
Geral (n = 5)					
M versus m	1,34 (0,73, 2,45)	0,34	88%	P<0,00001	R
m versus M	0,75 (0,41, 1,37)	0,34	88%	P<0,00001	R
MM versus mm	2,07 (0,76, 5,61)	P<0,15	81%	0,001	R
mm versus MM	0,48 (0,18, 1,31)	P<0,15	81%	0,001	R
MM versus Mm + mm	2,59 (0,62, 10,85)	0,19	93%	P<0,00001	R
Mm versus MM + mm	0,70 (0,41, 1,20)	0,19	67%	0,03	R
Caucasianos (n = 2)					
M versus m	0,83 (0,48, 1,44)	0,52	NO	-	F
m versus M	1,20 (0,69, 2,08)	0,52	NO	-	F
MM versus mm	1,77 (0,49, 6,46)	0,39	NO	-	F
mm versus MM	0,56 (0,15, 2,06)	0,39	NO	-	F
MM versus Mm + mm	2,90 (0,82, 10,27)	0,10	NO	-	F
Mm versus MM + mm	0,36 (0,17, 0,76)	0,008	NO	-	F
Asiáticos (n = 2)					
M versus m	1,69 (0,65, 4,42)	0,28	95%	P<0,00001	R
m versus M	0,59 (0,23, 1,54)	0,28	95%	P<0,00001	R
MM versus mm	2,58 (1,74, 3,81)	P<0,00001	93%	0,0001	R
mm versus MM	0,39 (0,26, 0,57)	P<0,00001	93%	0,0001	R
MM versus Mm + mm	3,18 (0,34, 29,37)	0,31	98%	P<0,00001	R
Mm versus MM + mm	0,72 (0,36, 1,45)	0,36	72%	0,06	R

Legenda: M-mutado, m-selvagem, OR-Odds Ratio, IC-Intervalo de confiança, I²-heterogeneidade, R-efeitos aleatórios, F-efeito-fixo, NO-Não obtido por limitação estatística

Fonte: Próprio autor

Figura 3 – Gráfico de *Funnel plot* para detecção de viés de publicação nesta metanálise



Fonte: Próprio autor

Discussão

Esta é a primeira metanálise que aborda a associação entre o polimorfismo mencionado e periodontite. A periodontite é uma doença oral de elevada prevalência que pode acarretar perda dental. Estudos em gêmeos demonstraram o papel genético no desenvolvimento da periodontite (MICHALOWICZ et al., 2000), em que o risco da doença aumenta quando influenciado por polimorfismos genéticos em moléculas imunes do hospedeiro. Diversas metanálises anteriores trazem resultados acerca da associação entre polimorfismos nos genes IL1A (SILVA et al., 2017a), IL1B (SILVA et al., 2018; ZENG et al., 2015), IL6 (SONG et al., 2013), IL10 (ALBUQUERQUE et al., 2012) e IL17A/F (SILVA et al., 2017b) e os diversos aspectos clínicos da periodontite, bem como na falha em implantes dentais (LIAO et al., 2014).

A metanálise é considerada como uma ferramenta estatística em estudos genéticos devido neste tipo de estudo ocorrer o que os autores classificam como limitada cobertura de variabilidade genética. Portanto, o uso de metanálises aumentou pela maior capacidade de detectar associação significativa entre estudos, especialmente metanálises com maior tamanho amostral (ZEGGINI; IOANNIDIS, 2009).

A presente metanálise mostrou uma associação não significativa entre esta variação genética e a doença em todas as avaliações alélicas. Este achado está de acordo com um estudo prévio em que o polimorfismo -330 T/G na já citada IL não foi associado ao risco de falha em implante dental (CAMPOS et al., 2005) ou diabetes tipo 1 (FICHNA et al., 2013). Variações genéticas no IL2 podem contribuir com processos inflamatórios, como visto em resultados em que o total dos níveis de IL-2 foram três vezes maior em indivíduos homocigotos para o alelo G no polimorfismo -330 T/G que indivíduos portadores dos genótipos TT e TG em cultura de linfócitos do sangue periférico (HOFFMANN et al., 2001).

A IL-2 tem importante papel durante a inflamação pelo aumento da atividade citolítica de células NK e diferenciação de células *Treg* (LIAO et al., 2011). A persistente estimulação da IL-2 induz efetividade na expansão e desenvolvimento citolítico de células T de memória (PIPKIN et al., 2010) e parece promover indução da morte celular por linfócitos (LAURENCE et al., 2007). Estas evidências juntas podem esclarecer o real papel da IL-2 na periodontite. Além disso, nós consideramos que diferenças raciais e étnicas podem influenciar no papel de variações genéticas em genes de citocinas (HOFFMANN et al., 2002).

Esta metanálise objetivou avaliar a influência de diferentes grupos étnicos nos resultados. Como mostrado na tabela 1, os estudos inclusos foram realizados em diferentes grupos étnicos em que a população miscigenada foi representado por apenas um único estudo; e as etnias Caucásiana e Asiática foram representadas por dois estudos. Portanto, realizamos cálculos para uma análise estratificada em ambos estes grupos étnicos.

Houve uma maior prevalência do alelo T do polimorfismo -330 T/G em indivíduos brancos dos Estados Unidos em comparação com indivíduos africanos/americanos (COX et al., 2001) e apresentou o valor de 0,0656 na *Minor Allele Frequency* (MAF) em indivíduos de ancestralidade africana e americana (NCBI 2018). Em indivíduos do Oeste Asiático, o valor de MAF do alelo T foi de 0,6452, maior que os americanos. Os cálculos desta metanálise mostraram uma associação não significativa entre o polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e periodontite na avaliação por etnia. É interessante notar os resultados similares para Caucásianos e Asiáticos, muito embora haja diferenças na MAF do alelo T dentro destas distintas populações.

Embora, pelo nosso conhecimento, esta seja a primeira metanálise a focar na determinação da associação entre este polimorfismo no gene IL2 e periodontite com um significativo número de participantes, a metanálise apresentou importantes limitações que devem ser denotadas.

Primeiro, cinco estudos foram inclusos na síntese quantitativa. Este limitado número de estudos não é suficiente para mostrar robustez nos resultados e pode ser uma fonte de viés. Contudo, visto esta limitação, os autores utilizaram métodos estatísticos acurados para validar estes achados. Secundo, fatores importantes associados aos pacientes não estiveram disponíveis nos artigos inclusos. Uma completa avaliação sobre fatores de ajustamento tais como: gênero, fumantes e não-fumantes, idade estratificada e outras condições que podem influenciar o desenvolvimento da periodontite não foi possível devido os limitados dados inclusos no estudo. Terceiro, a periodontite é uma doença que recebe diversas classificações clínicas. Uma avaliação com base em diferentes diagnósticos da periodontite não foi possível. Além disso, uma nova classificação para a doença foi proposta e deve ser considerada para futuros estudos (CATON et al., 2018). Quarto, quase todos os cálculos foram interferidos pela heterogeneidade e uso do modelo estatístico de efeitos aleatórios. A heterogeneidade prova o quanto os estudos são inconsistentes o que pode ser um importante fator nos cálculos da metanálise pois a presença ou ausência de

heterogeneidade afeta o modelo estatístico aplicado aos dados (HUEDO-MEDINA et al., 2006). O uso do modelo de efeitos aleatórios nos resultados promove maior peso a estudos contendo reduzido tamanho amostral e deve ser considerado não totalmente confiável (KAVVOURA; IOANNIDIS, 2008). Quinto, diversas associações não significativas foram encontradas nos cálculos da metanálise. Contudo, um valor não significativo de P nem sempre reflete a ausência de relevância clínica (CHAMBRONE; ARMITAGE, 2016) o que nos leva a considerar estes resultados com cautela.

Futuros estudos devem focar em determinar a real associação entre o polimorfismo -330 T/G e periodontite correlacionada a outros fatores que possam promover progressão da doença (consumo de álcool, pacientes fumantes e outras classificações clínicas da periodontite) bem como outros grupos étnicos. Igualmente, futuros estudos para determinar a influência dos haplótipos entre este polimorfismo com outras variações genéticas são requeridos com maior conhecimento acerca de fatores genéticos e o risco de desenvolvimento de periodontite.

Conclusões

Em conclusão, dentro destas limitações, esta recente metanálise mostrou uma associação não significativa entre o polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e CP em todas as avaliações alélicas com aumento de heterogeneidade e ausência de viés de publicação.

Referências

- Aimetti M, Perotto S, Castiglione A, et al. Prevalence of periodontitis in an adult population from an urban area in North Italy: findings from a cross-sectional population-based epidemiological survey. *J Clin Periodontol.* 2015;42:622-631. doi: 10.1111/jcpe.12420.
- Albuquerque CM, Cortinhas AJ, Morinha FJ, et al. Association of the IL-10 polymorphisms and periodontitis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012;39:9319-9329. <http://doi.org/10.1007/s11033-012-1738-1>.
- Campos MI, Santos MCG, Trevalatto PC, et al. Interleukin-2 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms, and early failure of dental implants. *Implant Dent.* 2005;14:391-398.
- Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S1-S8. doi: 10.1111/jcpe.12935.
- Chambrone L, Armitage GC. Commentary: statistical significance versus clinical relevance in periodontal research: implications for clinical practice. *J Periodontol.* 2016;87:613–616. doi: 10.1902/jop.2016.150554.

- Chen XT, Tan JY, Lei LH, et al. Cytokine levels in plasma and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis. *Am J Dent*. 2015;28:9-12.
- Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett* 2014;162:23-38. doi: 10.1016/j.imlet.2014.08.017.
- Cox ED, Hoffmann SC, DiMercurio BS, et al. Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. *Transplantation*. 2001;72:720-276.
- Eke PI, Dye BA, Wei L, et al. Update on prevalence of periodontitis in adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*. 2015;86:611-622. doi: 10.1902/jop.2015.140520.
- Fichna M, Zurawek M, Fichna P, et al. Polymorphic variant at the IL-2 region is associated with type 1 diabetes and may affect serum levels of interleukin-2. *Mol Biol Rep*. 2013;40:6957-6963. doi: 10.1007/s11033-013-2815-9.
- Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, et al. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis—a comprehensive review. *J Clin Periodontol*. 2017;44:94-105. doi: 10.1111/jcpe.12677.
- Górska R, Gregorek H, Kowalski J, et al. 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.
- Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro production in anti CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation*. 2001;72:1444-1450.
- Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, et al. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. *Am J Transplant*. 2002;2:560-567.
- Holde GE, Oscarson N, Trovik TA, et al. Periodontitis prevalence and severity in adults: a cross-sectional study in Norwegian Circumpolar Communities. *J Periodontol*. 2017;88:1012-1022. doi: 10.7717/peerj.5258.
- Hoyer KK, Dooms H, Barron L, et al. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev*. 2008;226:19-28. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00697.x.
- Huedo-Medina TB, Sánchez-Meca J, Marín-Martínez F, et al. Assessing heterogeneity in meta-analysis: Q statistic or I² index?. *Psychol Methods*. 2006;11:193-206.
- John S, Turner D, Donn R, et al. Two novel biallelic polymorphisms in the IL-2 gene. *Eur J Immunogenet*. 1998;25:419-420. doi:10.1046/j.1365-2370.1998.00139.x
- Kavvoura FK, Ioannidis JPA. Methods for meta-analysis in genetic association studies: a review of their potential and pitfalls. *Hum Genet*. 2008;123:1-14.
- Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:283-294. doi: 10.1038/nri3823.

- Knight ET, Liu J, Seymour GJ, et al. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2016;71:22-51. doi: 10.1111/prd.12110.
- Lan RY, Selmi C, Gershwin ME. The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). *J Autoimmun* 31:7-12. 10.1016/j.jaut.2008.03.002.
- Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*. 2007;26:371-381.
- Lertpimonchai A, Rattanasari S, Vallibhakasa A-OS et al. The association between oral hygiene and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Dent J*. 2017;67:332-343. doi: 10.1111/idj.12317.
- Li G, Yue Y, Tian Y, et al. Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1, 3, 9, interleukin (IL)-2, 8 and cyclooxygenase (COX)-2 gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population. *Cytokine*. 2012;60:552-560. doi: 10.1016/j.cyto.2012.06.239.
- Liao J, Li C, Wang Y, Ten M, et al. Meta-analysis of the association between common interleukin-1 polymorphisms and dental implant failure. *Mol Biol Rep*. 2014;41:2789-2798. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3133-6>.
- Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Leonard. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2011;23:598-604. doi: 10.1016/j.coi.2011.08.003.
- López R, Baelum V. Periodontal disease classifications revisited. *Eur J Oral Sci*. 2015;123:385-389. doi: 10.1111/eos.12227.
- Majumder P, Panda SK, Ghosh S, et al. Interleukin gene polymorphisms in chronic periodontitis: a case-control study in Indian population. *Arch Oral Biol*. 2019;101:156-164. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.03.015.
- Mao M, Zeng XT, Ma T, et al. Interleukin-1 α – 899 (+4845) C→T polymorphism increases the risk of chronic periodontitis: evidence from a meta-analysis of 23 case-control studies. *Gene*. 2013;532:121-126. doi: 10.1016/j.gene.2013.09.043.
- Michalowicz SB, Aeppli D, Virag JG, et al. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol*. 2000;62:293-299.
- Moher D, Shamseer L, Ghersi D, et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Med*. 2009;21:e1000097. doi: 10.1371/journal.pmed.1000097.
- National Center for Biotechnology Information – NCBI. 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes>. Accessed 11 June 2019.
- Nibali L. Suggested guidelines for systematic reviews of periodontal genetic association studies. *J Clin Periodontol*. 2013;40:753-756. doi: 10.1111/jcpe.12128.
- Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78:1387-1399.
- Pipkin ME, Sacks JA, Cruz-Guillot F, et al. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity*. 2010;32:79-90. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.012.

Reichert S, Machulla HK, Klapproth J, et al. Interleukin-2 -330 and 166 gene polymorphisms in relation to aggressive or chronic periodontitis and the presence of periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res.* 2009;44:628-635. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01173.x.

Sajadi M, Shahmohammadi A, Mahmazi S, et al. Study of association between interleukin-8 -845 T/C and +781 C/T polymorphisms with periodontitis disease among population from Western Iran. *Mol Biol Rep.* 2018;45:1263-1268. doi: 10.1007/s11033-018-4282-9.

Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, et al. Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002;29:587-591.

Silva FRP, Pessoa LS, Vasconcelos ACCG, et al. Polymorphisms in interleukins 17A and 17F genes and periodontitis: results from a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2017;44:443-453. doi: 10.1007/s11033-017-4128-x.

Silva FRP, Vasconcelos ACCG, França LFC, et al. Association between the rs1143634 polymorphism in interleukin-1B and chronic periodontitis: results from a meta-analysis composed by 54 case/control studies. *Gene.* 2018;668:97-106. doi: 10.1016/j.gene.2018.05.067.

Silva FRP, Vasconcelos ACCG, França LFC, et al. Relationship between-889 C/T polymorphism in interleukin-1A gene and risk of chronic periodontitis: evidence from a meta-analysis with new published findings. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017;22:e7-e14. doi: 10.4317/medoral.21233.

Silva MK, Carvalho ACG, Alves EHP, et al. Genetic Factors and the risk of periodontitis development: findings from a systematic review composed of 13 studies of meta-analysis with 71,531 participants. *Int J Dent.* 2017:1914073. doi: 10.1155/2017/1914073.

Song GG, Choi SJ, Ji JD, Lee YH. Association between tumor necrosis factor- α promoter -308 A/G, -238 A/G, interleukin-6 -174 G/C and -572 G/C polymorphisms and periodontal diseases: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2013;40:5191-5203. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2621-4>.

Susin C, Haas AN, Albandar JM Epidemiology and demographics of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2014;65:27-45. doi: 10.1111/prd.12019.

Vahabi S, Nazemisalman B, Hosseipour S, et al. Interleukin-2,-16, and-17 gene polymorphisms in Iranian patients with chronic periodontitis. *J Investig Clin Dent.* 2018;9:e12319. doi: 10.1111/jicd.12319.

Wang C-J, Wang C, Han JH, et al. Effect of combined treatment with recombinant interleukin-2 and allicin on pancreatic cancer. *Mol Biol Rep.* 2013;40:6579-6585. doi: 10.1007/s11033-013-2766-1.

Zeggini E, Ioannidis JPA. Meta-analysis in genome-wide association studies. *Pharmacogenomics.* 2009;10:191-201. doi: 10.2217/14622416.10.2.191.

Zeng XT, Liu DY, Kwong JS, et al. Meta-analysis of association between interleukin-1 β C-511T polymorphism and chronic periodontitis susceptibility. *J Periodontol.* 2015;86:812-819. doi: 10.1902/jop.2015.140698.

4 Capítulo III

4.1 Artigo 2

Associação entre um polimorfismo no gene ANRIL e periodontite: achados de uma metanálise

Felipe Rodolfo Pereira da Silva^{1,2}, Alessandro Luiz Araújo Bentes Leal³, Daniel Fernando Pereira Vasconcelos⁴, Jae Il Shin⁵, Larissa dos Santos Pessoa⁴, Grazyelle Sebreński da Silva², José Fernando Marques Barcellos^{1,2}

¹ Aluno de Doutorado no Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil;

² Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil;

³ Departamento de Farmácia, Universidade do Norte (UNINORTE), Manaus, Amazonas;

⁴ Laboratório de Análise e Processamento Histológico (LAPHIS), Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil;

⁵ Escola de Medicina da Universidade de Yonsei, Seul, República da Coreia;

Autor correspondente: Felipe Rodolfo Pereira da Silva

Email: feliperodolfo.15@hotmail.com.

Endereço postal: Departamento de Morfologia, Avenida General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado, Manaus, Amazonas, CEP: 69067-005. Número de telefone: +5592992873755.

Esclarecimentos

- O polimorfismo rs1333048 foi significativamente associado ao risco de periodontite.
- O polimorfismo rs1333048 foi associado ao risco de periodontite em população Caucasiana.
- O polimorfismo não foi associado com a periodontite em população miscigenada.
- Esta recente metanálise não foi interferida por viés de publicação.

Resumo

Objetivo: Avaliar a associação entre um polimorfismo de nucleotídeo único no gene ANRIL e o risco de periodontite por meio de metanálise.

Design: Uma busca na literatura foi realizada para estudos publicados anteriormente à 20 de Outubro de 2019 em diversas bases de dados educacionais e científicas. Uma análise estatística foi realizada pelo programa estatístico *Review Manager* com cálculos de heterogeneidade (I^2) e *Odds Ratio* (OR) com 95% de intervalo de confiança (IC). O viés de publicação foi avaliado pelos testes de *Begg* e *Egger* com o programa *Comprehensive meta-analysis*. O Valor de $P < 0,05$ foi considerado como significativo.

Resultado: Sete artigos com 12 estudos em 5.489 participantes de diferentes grupos étnicos compuseram os resultados. Houve uma significativa associação entre o alelo mutado no polimorfismo rs1333048 no gene ANRIL e o risco de periodontite (OR=1,24 IC: 1,15-1,34, $P < 0,00001$) e o alelo selvagem foi associado ao grupo controle (OR=0,80 IC: 0,75-0,87, $P < 0,00001$) ambos com valor estatisticamente significativo bem como reduzido valor de I^2 (28%, $P_{heterogeneidade} = 0,17$). Não houve risco significativo de viés de publicação ($P > 0,05$).

Conclusões: Esta metanálise mostrou a significativa associação entre o polimorfismo anteriormente mencionado e periodontite na análise geral e no grupo Caucasiano, mas não para população miscigenada.

Palavras-chave: doença periodontal; RNA; alelos; Odds Ratio; metilação do DNA.

Introdução

As doenças periodontais são um grupo de desordens inflamatórias que atingem as estruturas de suporte ao redor dos dentes resultando em possível perda dental (KINANE; STATHOUPOULOU; PAPAPANOU, 2017). A etiologia da doença é bem descrita pelo estado disbiótico entre as populações microbianas orais e a resposta imune do hospedeiro (SILVA et al., 2015). A doença foi associada a diversas condições sistêmicas tais como diabetes (ZHOU et al., 2015), disfunção endotelial (CAMPI et al., 2016) e até mesmo parâmetros sanguíneos podem ser afetados pela periodontite (FRANÇA et al., 2019)

As doenças periodontais recebem diversas classificações, em que as formas de periodontite crônica e agressiva (CP e AgP, respectivamente) são as mais comuns. A CP é caracterizada pela lenta e discreta progressão atingindo sujeitos de maior média de idade (LÓPEZ; BAELUM, 2014) enquanto que a AgP tem um rápido padrão linear de destruição tecidual com desenvolvimento precoce dos sítios periodontais inflamados (ALBANDAR, 2014).

A epidemiologia das doenças periodontais é bem variada devido viés na avaliação clínica (NAZIR, 2017). Contudo, recentes dados mostraram que estas doenças atingiram significativa prevalência mundial com 10% da população global sendo afetada pela forma severa da periodontite (FRENCKEN et al., 2017). Além disso, na Noruega, o total de 49,5% de 1.911 pacientes tiveram periodontite (HOLDE et al., 2017) e nos Estados Unidos, a periodontite atingiu 42% de adultos com 30 anos ou mais (EKE et al., 2018). Igualmente, a periodontite teve elevada prevalência na Itália (AIMETII et al., 2015), em uma jovem população do Marrocos (KISSA et al., 2016) e também em Brasileiros (SUSIN; HAAS; ALBANDAR, 2014).

Diversos fatores estão envolvidos no desenvolvimento e progressão da periodontite desde má higiene bucal (LERTPIMONCHAI et al., 2017) a específicas espécies bacterianas na região subgengival (MIRA; SIMON-SORO; CURTIS, 2017) ou mesmo fatores genéticos em mediadores inflamatórios (SILVA et al., 2017a; YANG; HUANG, 2019). Em complemento, eventos epigenéticos também são sugestivos como contribuintes para o desenvolvimento de periodontite pelas diferenças na expressão local de genes associados à inflamação (LARSSON, 2017).

Eventos epigenéticos são complexos, potencialmente reversíveis, que afetam o gene mas não por mudanças na sequência de DNA e sim envolvendo os processos de metilação do DNA, modificação de histonas e regulação gênica pelos longos não

codificadores RNA's (lncRNA's) (LUO et al., 2018). Diversas hipóteses sugerem que os lncRNA's interagem com a maquinaria de modificação de histonas e portanto contribuem com condições biológicas desde câncer até doenças inflamatórias (BOCHENEK et al., 2013; KHORSHIDI et al., 2017).

O não codificante RNA antissenso no locus INK4 (ANRIL) é um destes lncRNA's identificados como molécula candidata para periodontite (SCHAEFER, 2018). O ANRIL regula a expressão de múltiplos genes por mecanismos *cis* e *trans* via interação com as DNA metiltransferases e outras proteínas (AARABI et al., 2018). O ANRIL foi determinado como importante contribuinte para o câncer (GAMEL et al., 2017) e vem recebendo considerável atenção recentemente.

Uma metanálise anterior identificou que a elevada expressão de ANRIL foi significativamente associada a estágios avançados de câncer humano (WANG et al., 2018). Por outro lado, outra metanálise composta por 12.005 participantes trouxe significativa associação entre um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene ANRIL e doença arterial coronariana (XU et al., 2018).

O primeiro estudo a focar na determinação da interação entre polimorfismos no gene ANRIL e periodontite foi realizado por Schaefer et al. (2009) e encontrou significativa associação entre dois polimorfismos (rs1333042 and rs1333048) e a forma generalizada de AgP. Um estudo posterior em população chinesa não encontrou associação significativa entre esses polimorfismos e o risco da doença (CHEN et al., 2012).

A literatura traz outros importantes dados acerca de SNP's no gene ANRIL e periodontite (ERNST et al., 2010; SCHAEFER et al., 2011). Além disso, houve uma significativa super regulação do gene ANRIL na progressão do osteossarcoma (YU et al., 2018) representando o papel do ANRIL na biologia óssea e possivelmente na periodontite. Contudo os resultados permanecem contraditórios.

Estes achados contrários em estudos genéticos podem representar um desafio na pesquisa e observada a ausência de um estudo que agrupe estes dados, este estudo objetivou realizar uma metanálise abordando os resultados sobre o polimorfismo rs1333048 no gene ANRIL e periodontite.

Materiais e métodos

Esta metanálise está registrada na database PROSPERO com o seguinte número: CRD42018116487.

Para o delineamento e realização deste estudo os autores utilizaram o protocolo PRISMA (MOHER et al., 2009).

Crêterios de inclusão

Os seguintes critérios de foram usados no processo de coleta na busca da literatura: (1) estudos do tipo caso-controle ou de replica o genética; (2) os pacientes do grupo caso terem recebido o diagnóstico de periodontite (bem como suas diversas manifesta es clínicas) seguindo uma rigorosa avalia o clínica (PAGE; EKE, 2007); (3) o grupo controle ter apresentado avalia o periodontal saudável; (4) as frequências genotípicas terem sido totalmente documentadas; (5) o estudo ter sido realizado em humanos; (6) os participantes inclusos (casos e controles) não terem apresentado doenças cardiovasculares, condi es autoimunes ou gravidez.

Por ser uma metanálise, este estudo não requer aprecia o ou aprova o por Comitê de  tica.

Estratégia de busca

A busca na literature foi realizada por dois investigadores independentes nas bases de dados *Google Scholar*, *MedLine*, *Pubmed*, *WAFANG* e *Web of Science*. A busca na literatura ocorreu para estudos publicados anteriormente a 20 de Outubro de 2019. A seguinte combina o de palavras chave foi usada: (*polymorphism* ou *genetic variation* ou *rs1333048 polymorphism*) e (*ANRIL human chromosome region 9p21.3*) e (*periodontitis* ou *periodontal disease* ou *chronic periodontitis* ou *aggressive periodontitis*). Nenhuma restri o de linguagem foi aplicada e as referências dos estudos inclusos foram avaliadas para possível identifica o de estudos adicionais.

Processo de coleta dos dados

Três investigadores coletaram os seguindo um formulário padronizado que compôs a tabela de características dos estudos inclusos presente nos resultados. Os dados foram extraídos por autor, ano de publica o, etnia/país dos participantes inclusos, modelo de estudo, diagnóstico clínico da doença, subgrupo avaliado, tamanho amostral, média de idade dos participantes, respeito ao Equ brio de Hardy-Weinberg (EHW), método de genotipagem e risco de viés que será descrito em seguida.

Determina o do risco de viés

Para verificar a qualidade metodológica dos estudos, o protocolo para revisões sistemáticas de estudos de associa o genética em periodontia proposto por Nibali

(2013) foi usado, estudos que obtiveram pontuação menor que 10 escores foram excluídos.

Análise estatística

O software estatístico *Review Manager* versão 5.3 (RevMan, *Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, 2012*) para revisões sistemáticas e metanálises foi usado nos cálculos. O viés de publicação foi avaliado pelo software estatístico *Comprehensive Meta-analysis* versão 3.3.070 (2014), disponível para treino.

A presença ou ausência de heterogeneidade (I^2), foi calculada pelo teste do qui-quadrado baseado no teste estatístico Q avaliado por Higgins e Thompson (2002) e analisada pelo gráfico de *Funnel-plot* para heterogeneidade. Quando o valor observado de I^2 não foi estatisticamente significativo ($I^2 < 50\%$, $P > 0,05$), os autores usaram o modelo de efeitos fixos para cálculo do *Odds Ratio* (OR) agrupado (MANTEL; HAENSZEL, 1959). Quando I^2 apresentou significância estatística ($I^2 > 50\%$, $P < 0,05$), o modelo de efeitos aleatórios foi usado para o cálculo de OR (DERSIMONIAN; LAIRD, 1986). O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Para determinar a exata influência da variação genética nos cálculos da metanálise, seis modelos genéticos foram calculados tomando como base “M” como alelo mutado e “m” como alelo selvagem. Assim, obtiveram-se comparações alélicas: (I) M versus m, (II) m versus M; comparações genotípicas: (III) MM versus mm, (IV) mm versus MM; E a combinação entre as variações genotípicas: (V) MM versus mm + Mm e (VI) Mm versus mm + MM. O teste de *Begg* (BEGG; MAZUMDAR, 1994) e o teste de regressão linear de *Egger* (EGGER et al., 1997) (com valor de $P < 0,05$) foram as análises estatísticas usadas para determinar potencial viés de publicação na metanálise, a assimetria no gráfico de *Funnel-plot* para viés de publicação também foi considerado. Em complemento, os autores realizaram uma análise sensitiva para avaliar a robustez dos resultados agrupados. Houve a omissão de cada estudo inclusos por vez para detectar efeitos individuais nas análises gerais. Todos os dados inclusos foram dados dicotômicos expressos por meio de OR com 95% de intervalo de confiança (CI) para determinar a possível associação entre a variação genética anteriormente mencionada e periodontite.

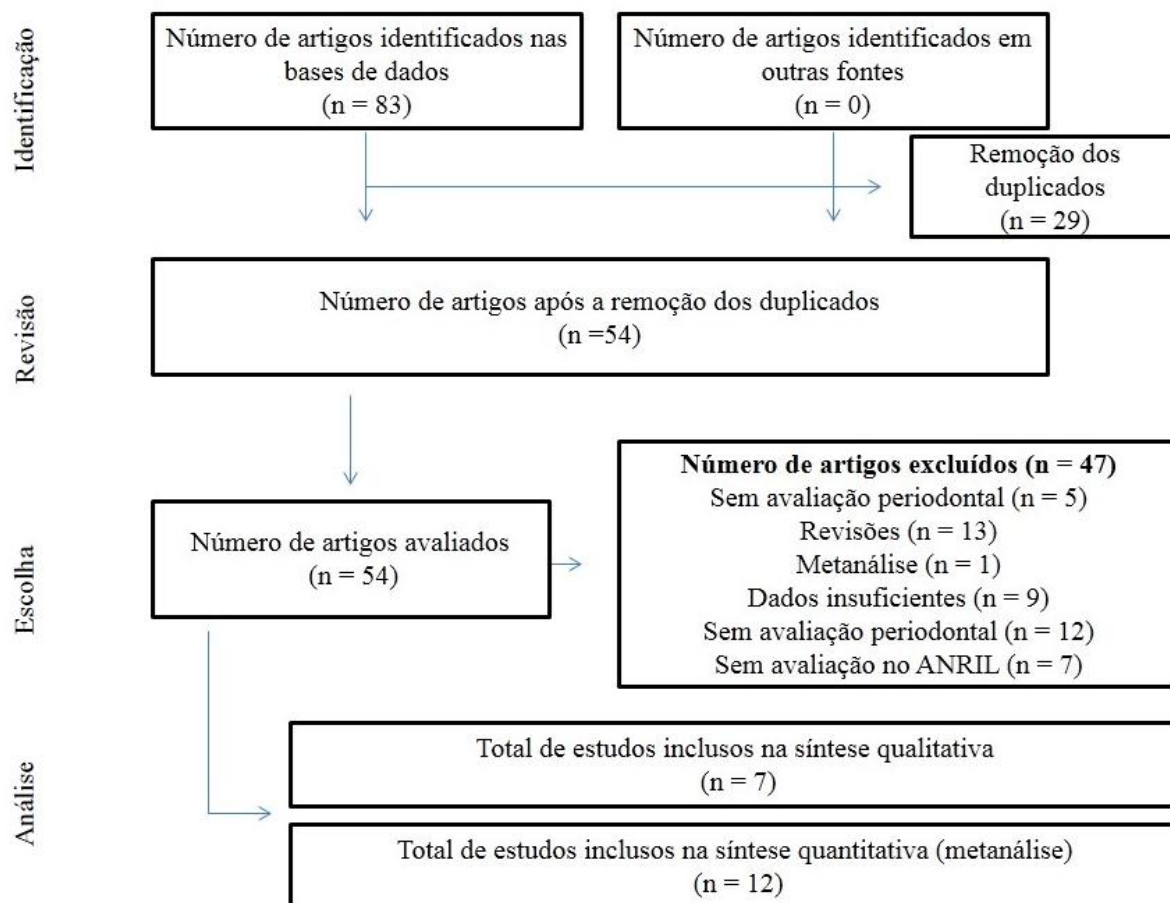
Resultados

Características dos estudos inclusos

A busca inicial na literatura resultou no total de 83 artigos identificados dentro

das bases de dados usadas. Após as etapas de revisão e avaliação de potencial elegibilidade, 47 artigos foram excluídos e sete permaneceram na síntese quantitativa como mostra a figura 1.

Figura 1 – Fluxograma de identificação, revisão, escolha e análise dos estudos incluídos nesta recente metanálise



As análises envolveram 5.489 participantes genotipados para o polimorfismo no gene ANRIL. Mais detalhes estão disponíveis na tabela 1.

Os artigos foram publicados entre 2009 e 2018 em diversos grupos étnicos totalizando sete artigos com 12 estudos sobre o polimorfismo no gene ANRIL e periodontite (CHEN et al., 2012; ERNEST et al., 2010; SCHAEFER et al., 2009; 2011; 2013; TAIETE et al., 2018; TEEUW et al., 2015). Os estudos foram realizados em Caucasianos de diferentes países (ERNEST et al., 2010; SCHAEFER et al., 2009; 2011; 2013; TEEUW et al., 2015), Asiáticos da China (CHEN et al., 2012) e população miscigenada do Brasil (TAIETE et al., 2018).

É importante notar que Schaefer et al. (2009) realizaram a avaliação genética em Caucasianos da Alemanha, Schaefer et al. (2009) em Caucasianos da Alemanha e Holanda e Schaefer et al. (2013) em Caucasianos da Turquia, Itália e Alemanha.

Tabela 1. Características dos estudos incluídos nesta metanálise.

Autor (ano)	Etnia/País	Modelo de estudo	Diagnóstico (Subtipos clínicos)	Subgrupo
Chen (2012)	Asiática/China	Caso/Controle	CP	-
Ernst (2010)	Caucasiana/Alemanha e Irlanda	Caso/Controle	gAgP	-
Schaefer (2009)	Caucasiana/Alemanha	Verificação/Replicação	gAgP LAgP	-
Schaefer (2011)	Caucasiana/Alemanha and Holanda	Caso/Controle	CP AgP	-
Schaefer (2013)	Caucasiana/Alemanha, Itália, Turquia	Exploração	AgP	Turquia Itália Alemanha
Taiete (2018)	Miscigenada/Brazil	Caso/Controle	AgP CP	-
Teeuw (2015)	Caucasiana/Holanda	Caso/Controle	P	-

Autor (ano)	N amostral (Cc/Co)	Idade (anos) (Cc/Co)	EHW (P _{valor})	Método de genotipagem	Escore
Chen (2012)	221/172	41,6±8,8/40,0±9,2	SIM	PCR tempo real	14
Ernst (2010)	130/339	15-35/40-80	SIM	PCR tempo real	13
Schaefer (2009)	151/736 137/368	38±6,6/63±7,4 37±7,0/37±9,6	SIM	SNPlex/TaqMan	14
Schaefer (2011)	154/421 159/421	45,2±9,5/32,3±9,0 33,8±4,7/32,3±9,0	SIM	SNPlex/TaqMan	15
Schaefer (2013)	89/72 44/99 594/1.441	-	SIM SIM SIM	Array Immunochip	18
Taiete (2018)	200/196 190/196	34,0±4,6/30,5±5,8 50,0±7,2/30,5±5,8	NÃO SIM	PCR-RFLP	17
Teeuw (2015)	115/56	45,5±9,9/43,9±13,2	SIM	TaqMan	16

Legenda: Cc-caso; Co-controle; EHW-Equilíbrio de Hardy-Weinberg, CP-Periodontite crônica; gAgP-Periodontite agressiva generalizada; LAgP-Periodontite agressiva localizada; AgP-Periodontite agressiva.

Fonte: Próprio autor

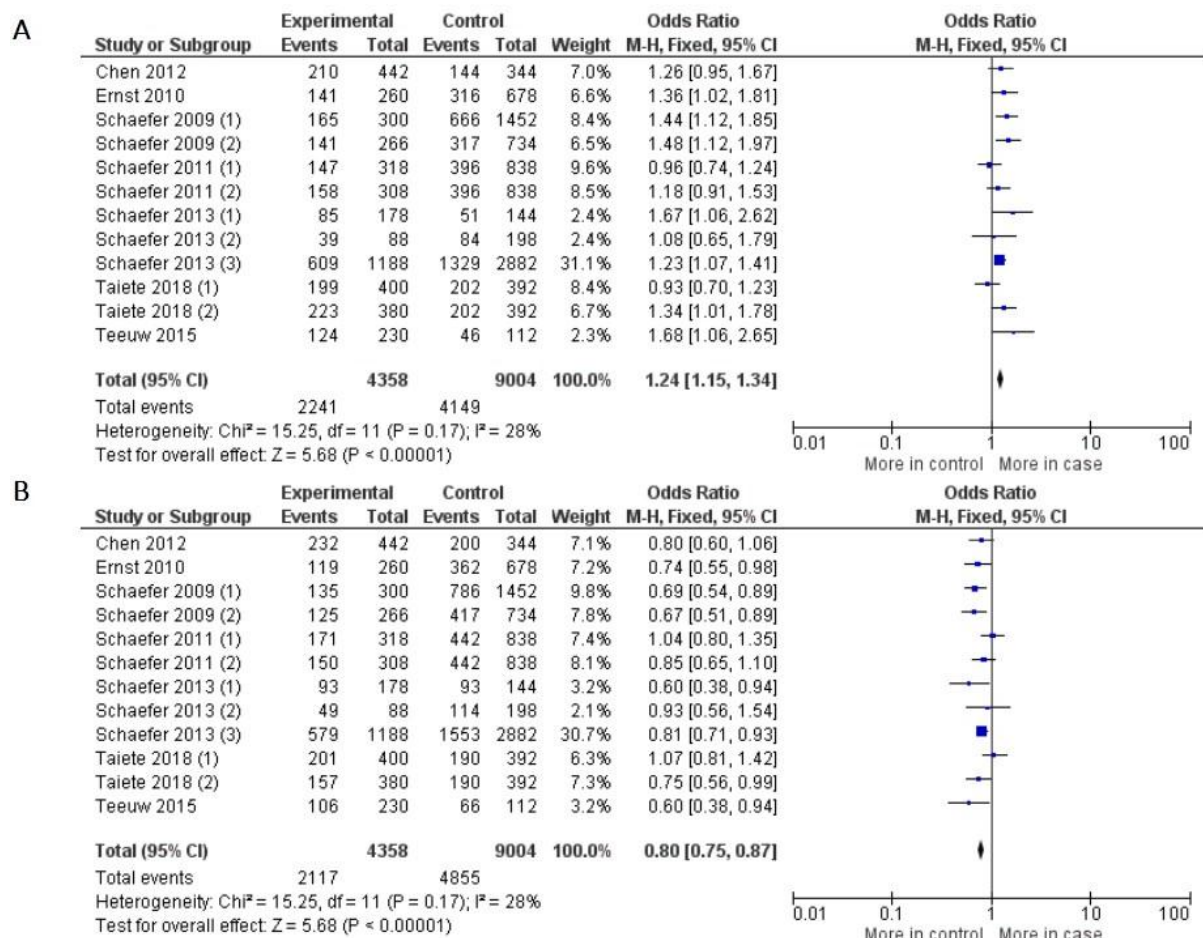
Cinco artigos realizaram estudos do tipo caso/controle (CHEN et al., 2012; ERNEST et al., 2010; SCHAEFER et al., 2011; TAIETE et al., 2018; TEEUW et al., 2015), um do tipo exploração (SCHAEFER et al., 2009) e um do tipo verificação/replicação (SCHAEFER et al., 2013). A periodontite foi diagnosticada nos estudos como CP (CHEN et al., 2012; SCHAEFER et al., 2011; TAIETE et al., 2018), AgP (SCHAEFER et al., 2011; 2013; TAIETE et al., 2018), AgP generalizada (ERNEST et al., 2010; SCHAEFER et al., 2009) e AgP localizada (SCHAEFER et al., 2009). Todos os estudos incluídos alcançaram mais de 10 pontos na escala proposta por Nibali (2013) como mostrado na tabela 1.

Análise estatística

Na análise geral, o alelo mutado no polimorfismo do gene ANRIL foi associado com o risco de desenvolvimento de periodontite (OR=1,24 IC:1,15-1,34, P<0,00001) e o alelo selvagem associado ao grupo controle (OR=0,80 IC: 0,75-0,87, P<0,00001)

ambos com significativo valor estatístico bem como reduzido valor de I^2 (28%, $P_{heterogeneity} = 0,17$) (Figura 2). Achados similares foram observados para o genótipo homocigoto mutante e o selvagem. Devido a não significativa interferência de heterogeneidade, o modelo estatístico de efeito-fixado foi aplicado nos cálculos. Os valores de OR e os dados sobre I^2 são apresentados na tabela 2. A avaliação por subgrupo demonstrou uma significativa associação entre o polimorfismo rs1333048 no gene ANRIL e as formas crônica ($P=0,006$) e agressiva ($P<0,0001$) da periodontite, para o grupo Caucásico ($P<0,0001$), mas não para população miscigenada ($P=0,55$). Nestas análises, o modelo de efeito-fixado foi aplicado devido ao reduzido valor de I^2 . Contudo, os cálculos para população miscigenada foram interferidos por significativo valor de heterogeneidade.

Figura 1. Metanálise de comparação para o polimorfismo rs1333048 no gene ANRIL e o risco de periodontite na análise geral para o alelo mutado versus o alelo selvagem (A) e o alelo selvagem versus o mutado (B).



Fonte: Próprio autor

Tabela 2. Cálculo da metanálise sobre o polimorfismo rs1333048 no gene ANRIL e o risco de periodontite (comparações alélicas e genotípicas; análises de subgrupos).

Comparação (n)	OR (95% IC)	Pvalor (z test)	I ²	Pheterogeneidade	Modelo estatístico
Geral (n = 12)					
M versus m	1,24 (1,15-1,34)	P<0,00001	28%	P = 0,17	F
m versus M	0,80 (0,75-0,87)	P<0,00001	28%	P = 0,17	F
MM versus mm	1,53 (1,32-1,78)	P<0,00001	30%	P = 0,16	F
mm versus MM	0,65 (0,56-0,76)	P<0,00001	30%	P = 0,16	F
MM versus Mm/mm	1,38 (1,22-1,56)	P<0,00001	27%	P = 0,18	F
Mm versus MM/mm	0,97 (0,87-1,08)	P = 0,53	25%	P = 0,20	F
CP (n = 3)					
M versus m	1,25 (1,07-1,47)	P = 0,006	0%	P = 0,81	F
m versus M	0,80 (0,68-0,94)	P = 0,006	0%	P = 0,81	F
MM versus mm	1,58 (1,14-2,18)	P = 0,005	0%	P = 0,77	F
mm versus MM	0,63 (0,46-0,87)	P = 0,005	0%	P = 0,77	F
MM versus Mm/mm	1,36 (1,05-1,77)	P = 0,02	0%	P = 0,80	F
Mm versus MM/mm	0,98 (0,79-1,23)	P = 0,89	0%	P = 0,92	F
AgP (n = 8)					
M versus m	1,23 (1,13-1,34)	P<0,00001	47%	P = 0,07	F
m versus M	0,81 (0,75-0,89)	P<0,00001	47%	P = 0,07	F
MM versus mm	1,49 (1,25-1,77)	P<0,00001	48%	P = 0,06	F
mm versus MM	0,67 (0,57-0,80)	P<0,00001	48%	P = 0,06	F
MM versus Mm/mm	1,37 (1,19-1,58)	P<0,00001	51%	P = 0,05	F
Mm versus MM/mm	0,95 (0,84-1,08)	P = 0,44	49%	P = 0,06	F
Caucasianos (n = 9)					
M versus m	1,27 (1,16-1,38)	P<0,00001	25%	P = 0,22	F
m versus M	0,79 (0,72-0,86)	P<0,00001	25%	P = 0,22	F
MM versus mm	1,59 (1,34-1,88)	P<0,00001	26%	P = 0,21	F
mm versus MM	0,63 (0,53-0,74)	P<0,00001	26%	P = 0,21	F
MM versus Mm/mm	1,39 (1,21-1,60)	P<0,00001	43%	P = 0,08	F
Mm versus MM/mm	0,97 (0,87-1,08)	P = 0,94	33%	P = 0,15	F
Miscigenada (n = 2)					
M versus m	1,11 (0,91-1,36)	P = 0,55	68%	P = 0,08	R
m versus M	0,90 (0,63-1,28)	P = 0,55	68%	P = 0,08	R
MM versus mm	1,22 (0,83-1,81)	P = 0,55	70%	P = 0,07	R
mm versus MM	0,82 (0,55-1,21)	P = 0,55	70%	P = 0,07	R
MM versus Mm/mm	1,26 (0,93-1,72)	P = 0,14	0%	P = 0,49	F
Mm versus MM/mm	0,84 (0,64-1,11)	P = 0,23	30%	P = 0,23	F

Legenda: M-mutado, m-selvagem, OR-Odds Ratio, IC-Intervalo de confiança, I²-heterogeneidade, R-efeitos aleatórios, F-efeito-fixado.

Fonte: Próprio autor

Análise sensitiva e viés de publicação

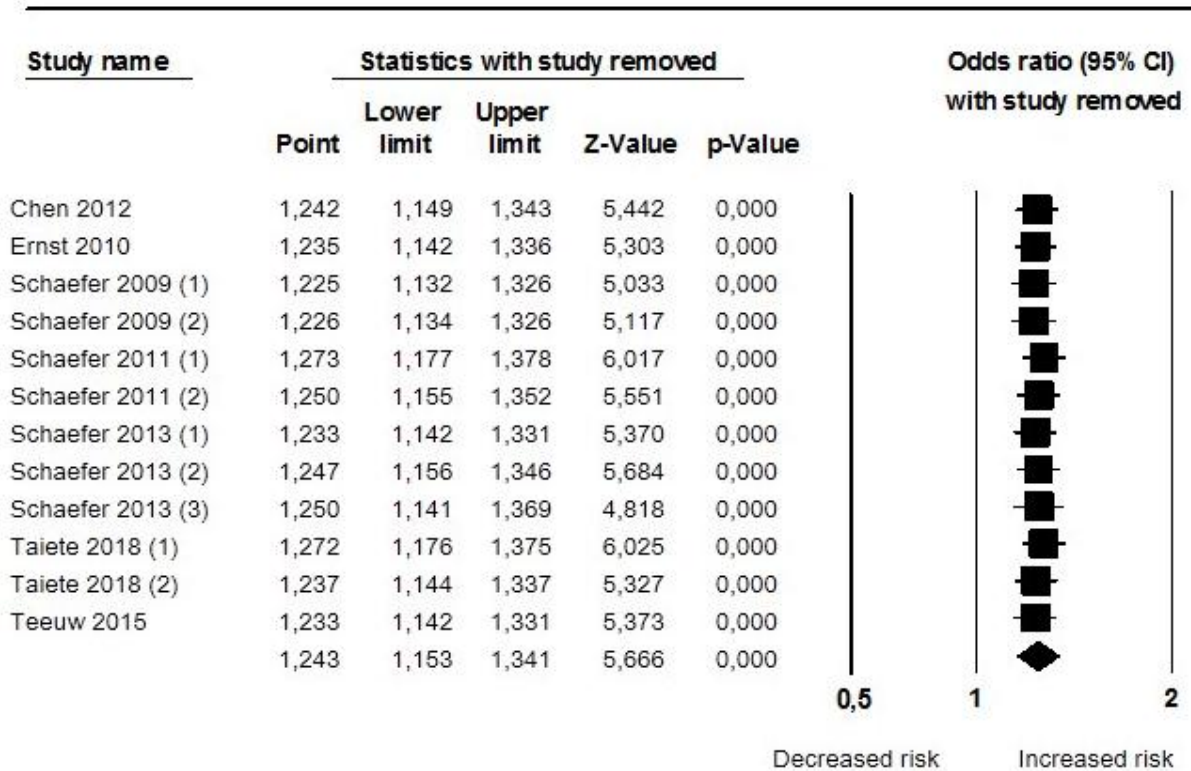
Os resultados sobre a análise sensitiva relevaram que nenhum estudo individual mudou significativamente os valores agrupados de OR, este dado demonstra a acurácia dos resultados (Figura 3). Além disso, nenhuma assimetria foi detectada no gráfico de *Funnel-plot* para o polimorfismo analisado nesta metanálise (Figura 4). O teste de regressão linear de *Egger* e o teste de *Begg* não evidenciaram qualquer viés de publicação para o polimorfismo rs1333048 e periodontite (P=0,477 e P=0,243), respectivamente.

Discussão

Esta é o primeiro estudo de metanálise que avalia um polimorfismo no gene ANRIL e periodontite. A não significativa heterogeneidade, a análise sensitiva, a

ausência de viés de publicação e os escores obtidos pelos estudos demonstraram a qualidade metodológica dos estudos inclusos e a acurácia dos nossos resultados.

Figura 3. Análise sensitiva com exclusão de um estudo por vez e verificação da possível mudança no valor de Odds Ratio agrupado.



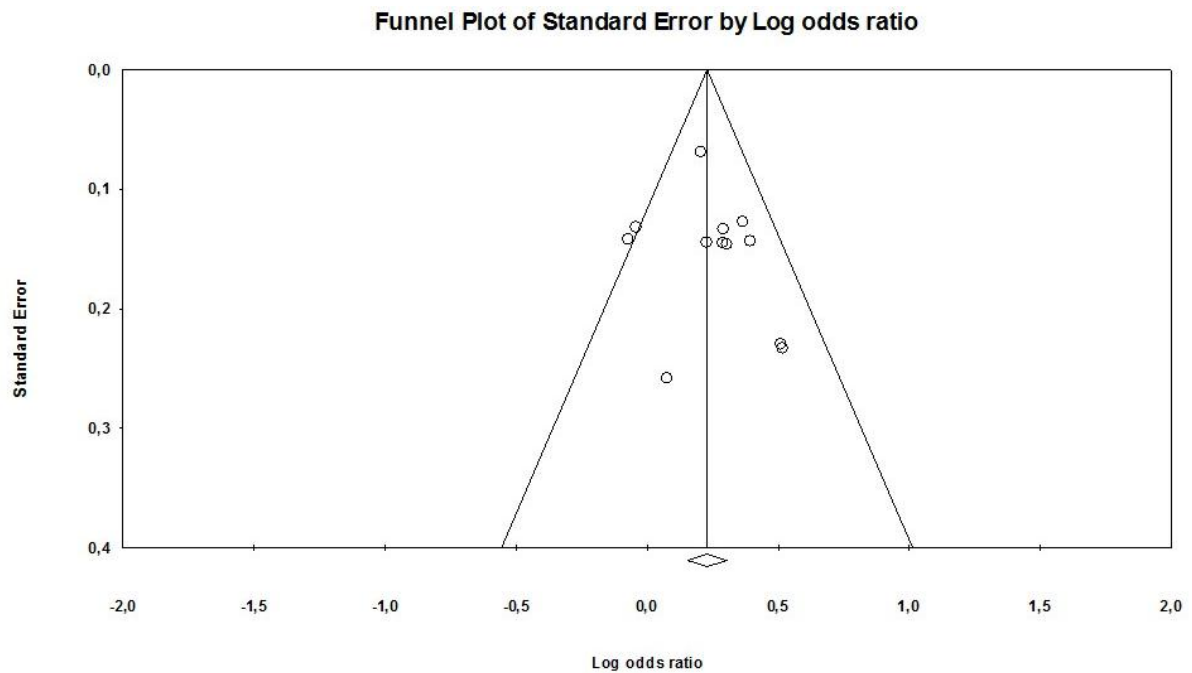
Fonte: Próprio autor

Em níveis genéticos, os resultados trouxeram significativa associação entre o alelo C no polimorfismo rs1333048 e periodontite ($P < 0,05$) com um aumentado valor de OR (OR=1,24). O alelo C teve uma significativa *Minor Allele Frequency* (MAF) na população global com valor de $C = 0,442$ (NCBI, 2018). Este dado corrobora um estudo anterior em que a MAF do alelo C foi significativamente aos pacientes diagnosticados com periodontite (TEEW et al., 2015). De fato, o alelo mutado neste SNP também foi associado ao maior risco de câncer de próstata e hiperplasia benigna deste órgão em pacientes Caucasianos do Irã (TAHERI et al., 2017).

Achados anteriores estão em desacordo com essas mencionadas associações. O polimorfismo rs1333048 somente foi associado ao risco de câncer em nível de haplótipo composto pelos alelos mutados no polimorfismo rs1333045 e os alelos selvagens dos polimorfismos rs13977574 e rs10757278 (KHORSHIDI et al., 2017) bem como com outros SNP's no gene ANRIL na esclerose múltipla (REZAZADEH et al., 2018).

O gene ANRIL é composto por 19 exons dentro de uma região de 126.3 kb dentro do *cluster* gênico localizado no locus 9p21.3 (PASMANT et al., 2011). Variações de *splicing* e polimorfismos genéticos no gene ANRIL foram associados com doença coronariana (FOLKERSEN et al., 2009), diabetes mellitus tipo 2 (ZEGGINI et al., 2007) e periodontite (SCHAEFER et al., 2011).

Figura 4. *Funnel-plot* para avaliação de viés de publicação nesta recente metanálise.



Fonte: Próprio autor

Além disso, um estudo anterior *in vitro* com células musculares lisas do revestimento vascular demonstrou que transcritos do ANRIL foram capazes de afetar os mecanismos fisiológicos dependentemente de variação no *splicing* alternativo em que o éxon 1 e éxon 19 puderam interferir na expressão de IL-1A e IL-1RN, respectivamente (COGRAINS et al., 2012). Também um estudo posterior em modelo de arterosclerose em ratos mostrou que o grupo com hiper-expressão de ANRIL na circulação sistêmica apresentou desorganização estrutural das artérias e significativo aumento de 69,1% nos níveis séricos de IL-1 que o grupo controle saudável ($P < 0,05$) (SONG et al., 2017). É bem descrito que a IL-1 participa de uma família de citocinas pró-inflamatórias e polimorfismos na IL1A (SILVA et al., 2017b), IL1B (SILVA et al., 2018) e IL-1RN (DING et al., 2012) foram associados à inflamação periodontal.

Bochenek et al. (2013) sugeriram que a ligação molecular entre a regulação do ANRIL e os mecanismos da periodontite e identificaram que transcritos do ANRIL

contendo o éxon 13 foram correlacionados com o aumento da expressão de genes chave do metabolismo da glicose e ácidos graxos em que polimorfismos nesses genes foram associados com AgP. Essa relação pode ser definida pela interação entre o ANRIL e as chamadas *Polycomb Repressive Complexes* (PRC's), um grupo de proteínas que tem papel chave na remodelação da cromatina (AARABI et al., 2018) e portanto, na inflamação (BAYARSAIHAN, 2011). Também, pela interferência nos mecanismos do Fator Nuclear kB (NF-kB) promovido pelo ANRIL (GOU et al., 2018) em que o NF-kB é um mediador chave na expressão de citocinas e dano periodontal (PRESHAW; TAYLOR, 2011). Contudo o papel exato dos transcritos do gene ANRIL em outras condições inflamatórias permanece ainda não muito bem esclarecido.

Semelhantemente à associação significativa observada na análise geral, também foi detectada significância na avaliação pelas diferentes formas da periodontite. Embora poucos estudos focaram na CP (n=3) em comparação com a AgP (n=8), os resultados foram similares (tabela 2) e eles mostraram uma significativa associação com aumentado valor de OR. Ambas as formas da doença são características de terem uma etiologia complexa; entretanto, estudos anteriores já indicaram o papel crítico de lncRNA's na patogênese da periodontite (ZHOU et al., 2015) e na forma agressiva da doença (LI et al., 2018).

Expandindo os resultados na tentativa de avaliar a interferência de fatores de ajustamento nas análises gerais, esta metanálise estratificou os estudos com base na etnia dos participantes em que as populações Caucásicas e Miscigenadas compuseram essa estratificação. Uma significativa associação foi identificada no grupo Caucásico (Tabela 2) o que é compreensível a obtenção de tais dados vista a prévia associação de polimorfismos no gene ANRIL e periodontite (SCHAEFER et al., 2009) e outras alterações em Caucásicos (CUNNINGTON et al., 2010; TAHERI et al., 2017).

O polimorfismo rs1333048 não teve uma significativa associação com periodontite na população Miscigenada ($P > 0,05$). Isso pode ser explicado por dois importantes fatores: o número limitado de estudos inclusos para esta população (n=2) e o aumentado valor de I^2 . Além disso, a população Miscigenada em questão é do Brasil; Brasileiros são um grupo de indivíduos caracterizados pelo elevado grau de mescla genética (KEHDY et al., 2015).

Embora os resultados desta metanálise puderam esclarecer a associação entre o polimorfismo rs1333048 e periodontite, importantes limitações devem ser notadas e portanto discutidas. Primeiro, a literatura não traz estudos que determinem o impacto

deste polimorfismo nos níveis de ANRIL durante a periodontite. Um estudo anterior mostrou que SNP's afetam a expressão do ANRIL em diversas doenças (CUNNINGTON et al., 2010). Teeuw et al. (2015) realizaram uma análise com a correlação entre o polimorfismo rs1333048 no ANRIL e os níveis de proteína C reativa; contudo, os níveis de ANRIL não foram avaliados. Segundo, a periodontite é uma doença complexa em que diversos fatores estão envolvidos na patogênese desta condição inflamatória como idade, sexo ou higiene oral e condições comportamentais como uso de álcool ou fumo. A presente metanálise não abordou a avaliação desses fatores de ajustamento devido os dados limitados nos estudos inclusos. Terceiro, uma completa avaliação sobre outras etnias como a Africana ou população Asiática não pode ser realizada devido à ausência de estudos com essas populações na literatura. Isso também pode explicar a não significativa associação na população Miscigenada. Quarto, a periodontite foi modificada em sua classificação clínica em que um novo modelo foi proposto dissolvendo as classificações anteriores de CP ou AgP (CATON et al., 2018), estudos futuros com periodontite devem admitir essa questão em seu delineamento experimental. Quinto, devemos ter cautela sobre os resultados apresentados quando tomamos como base o valor de P como padrão ouro de validade estatística, como anteriormente sugerido (NUZZO, 2014) devido o valor de P nem sempre representar uma significância clínica (CHAMBRONE; ARMITAGE, 2016). Portanto, futuros estudos *in vivo* ou *in silico* para validar esses achados são requeridos.

Conclusão

Esta metanálise composta por 12 estudos em 5.489 participantes mostrou a significativa associação entre o alelo mutado no polimorfismo rs1333048 no gene ANRIL e o risco de periodontite em ambas suas principais formas clínicas e no grupo Caucasiano.

Referências

- Aarabi, G., Zeller, T., Heydecke, G., Munz, M., Schaefer, A., & Seedorf, U. (2018). Roles of the Chr. 9p21.3 ANRIL locus in regulating inflammation and implications for anti-inflammatory drug target identification. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5, 47. doi: 10.3389/fcvm.2018.00047
- Aimetti, M., Perotto, S., Castiglione, A., Mariani, G. M., Ferrarotti, F., & Romano, F. (2015). Prevalence of periodontitis in an adult population from an urban area in North Italy: findings from a cross-sectional population-based epidemiological survey. *Journal of Clinical Periodontology*, 42, 622-631. doi: 10.1111/jcpe.12420

- Albandar, J. M. (2014). Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Periodontology* 2000, 65, 13-26. doi: 10.1111/prd.12014
- Bayarsaihan, D. (2011). Epigenetic mechanisms in inflammation. *Journal of Dental Research*, 90, 9-17. doi: 10.1177/0022034510378683
- Begg, C. D., & Mazumdar, M. (1994). Operation characteristics of a rank correlation test for publication bias. *Biometrics*, 50, 1088-1101.
- Bocheneck, G., Häslar, R., El Mokhtari, N. E., König, I. R., Loos, B. G., Jepsen, S., Rosenstiel, P., Schreiber, S., & Shaefer, A. S. (2013). The large non-coding RNA ANRIL, which is associated with atherosclerosis, periodontitis and several forms of cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3 and C11ORF10. *Human Molecular Genetics*, 22, 4516-4527. doi: 10.1093/hmg/ddt299
- Campi, P., Herrera, B. S., Jesus, F. N., Napolitano, M., Teixeira, S. A., Maia-Dantas, A., Spolidorio, L. C., Akamine, E. H., Mayer, M. P. A., Carvalho, M. H. C., Costa, S. K. P., & Muscara, M. N. (2016). Endothelial dysfunction in rats with ligature-induced periodontitis: Participation of nitric oxide and cyclooxygenase-2-derived products. *Archives of Oral Biology*, 63, 66-74. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.11.022
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S1-S8. doi: 10.1111/jcpe.12935
- Chambrone, L., & Armitage, G. C. (2016). Commentary: statistical significance versus clinical relevance in periodontal research: implications for clinical practice. *Journal of Periodontology*, 87, 613-616. doi: 10.1902/jop.2016.150554
- Chen, D., Wei, N., Bao, X. N., Wang, L. M., Zhou, C. F., Zhang, Y. L., & Zhang, J. (2012). Association of variants in chromosome 9p21.3 and chronic periodontitis in the Han Chinese population. *Shanghai Journal of Stomatology*, 21, 659-662. [in Chinese]
- Congrains, A., Kamide, K., Katsuya, T., Yasuda, O., Oguro, R., Yamamoto, K., Ohishi, M., & Rakugi, H. (2012). CVD-associated non-coding RNA, ANRIL, modulates expressions of atherogenic pathways in MSMC. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419, 612-616. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.050
- Cunnington, M. S., Santibanez, K. M., Mayosi B. M., Burn, J., & Keavney, B. (2010). Chromosome 9p21 SNPs associated with multiple diseases phenotypes correlate with ANRIL expression. *PLoS Genetics*, 6, e1000899. doi: 10.1371/journal.pgen.1000899
- Dersimonian, R., & Laird, N. (1986). Meta-analysis in clinical trials. *Controlled Clinical Trials*, 7, 177-188. doi: 10.1016/0197-2456(86)90046-2
- Ding, C., Zhao, L., Sun, Y., & Xu, Y. (2012). Interleukin-1 receptor antagonist polymorphism (rs2234663) and periodontitis susceptibility: a meta-analysis. *Archives of Oral Biology*, 57, 585-593. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.01.016

- Egger, M., Davey, S. G., Schneider, M., & Minder, C. (1997). Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 315, 629-634.
- Eke, P. I., Thornton-Evans, G. O., Wei, L., Borgnakke, W. S., Dye, B. A., & Genko, R. J. (2018). Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2014. *The Journal of the American Dental Association*, 149, 576-588. doi: 10.1016/j.adaj.2018.04.023
- Ernst, F. D., Uhr, K., Teumer, A., Fanghänel, J., Schulz, S., Noack, B., Gonzales, J., Reichert, S., Eickholz, P., Holtfreter, B., Meisel, P., Linden, G. J., Homuth, G., & Kocher, T. (2010). Replication of the association of chromosomal region 9p21.3 with generalized aggressive periodontitis (gAgP) using an independent case-control cohort. *BMC Medical Genetics*, 11, 119. doi: 10.1186/1471-2350-11-119
- Folkersen, L., Kyriakou, T., Goel, A., Peden, J., Mälarsting, A., Paulsson-Bern, G., Hamsten, A., Hugh, W., Franco-Cereceda, A., Gabrielsen, A., Eriksson, P., & PROCARDIS Consortia. (2009). Relationship between CAD risk genotype in the chromosome 9p21 locus and gene expression. Identification of eight new ANRIL splice variants. *PLoS One*, 4, e7677. doi: 10.1371/journal.pone.0007677
- França, L. F. C., Silva, F. R. P., Lenardo, D., Alves, E. H. P., Nascimento, H. M. S., Silva, I. A. T., Vasconcelos, A. C. C. G., & Vasconcelos, D. F. P. (2019). Comparative analysis of blood parameters of the erythrocyte lineage between patients with chronic periodontitis and healthy patients: Results obtained from a meta-analysis. *Archives of Oral Biology*, 97, 144-149. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.10.024
- Frencken, J. E., Sharma, P., Stenhouse, L., Green, D., Lavery, Dominic., & Dietrich, T. (2017). Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *Journal of Clinical Periodontology*, 44, S94-S105. doi:10.1111/jcpe.12677
- Guo, F., Tang, C., Li, Y., Liu, Y., Lv, P., Wang, W., & Mu, Y. (2018). The interplay of Lnc RNA ANRIL and miR-181b on the inflammation-relevant coronary artery disease through mediating NF- κ B signalling pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22, 5062-5075. doi: 10.1111/jcmm.13790
- Higgins, J. P. T., Thompson, S. G., (2002). Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Statistics in Medicine*, 21, 1539-1558. doi: 10.1002/sim.1186
- Holde, G. E., Oscarson, N., Trovik, T. A., Tillberg, A., & Jönsson, B. (2017). Periodontitis Prevalence and Severity in Adults: A Cross-Sectional Study in Norwegian Circumpolar Communities. *Journal of Periodontology*, 88, 1012-1022. doi: 10.1902/jop.2017.170164
- Kehdy, F. S., Gouveia, M. H., Machado, M., Magalhães, W. C., Horimoto, A. R., Horta, B. L., Moreira, R. G., Leal, T. P., Scliar, M. O., Soares-Souza, G. B., Rodrigues-Soares, F., Araújo, G. S., Zamudio, R., Sant Anna, H. P., Santos, H. C., Duarte, N. E., Fiaccone, R. L., Figueiredo, C. A., Silva, T. M., Costa, G. N., Beleza, S., Berg, D. E., Cabrera, L., Debortoli, G., Duarte, D., Ghirotto, S., Gilman, R. H., Gonçalves, V. F., Marrero, A. R., Muniz, Y. C., Weissensteiner, H., Yeager, M., Rodrigues, L. C., Barreto, M. L., Lima-Costa, M.F., Pereira, A. C., Rodrigues, M. R., Tarazona-Santos, E., & Brazilian EPIGEN Project Consortium. (2015). Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect

on the pattern of deleterious mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 8696-8701. doi: 10.1073/pnas.1504447112

Khorshidi, H. R., Taheri, M., Noroozi, R., Sarrafzadeh, S., Sayad, A., & Ghafouri-Fard, S. (2017). Anril genetic variants in Iranian breast cancer patients. *Cell Journal*, 19, 72. doi: 10.22074/cellj.2017.4496

Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17038. doi: 10.1038/nrdp.2017.38

Kissa, J., Chemlali, S., El Houari, B., Amine, K., Khilil, N., Mikou, S., Nadifi, S., & Albandar, J. M. (2016). Aggressive and chronic periodontitis in a population of Moroccan school students. *Journal of Clinical Periodontology*, 43, 934-939. doi: 10.1111/jcpe.12584

Larsson, L. (2017). Current Concepts of Epigenetics and Its Role in Periodontitis. *Current Oral Health Reports*, 4, 286-293. doi: 10.1007/s40496-017-0156-9

Lertpimonchai, A., Rattanasiri, S., Arj-Ong, V. S., Attia, J., & Thakkinstian, A. (2017). The association between oral hygiene and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *International Dental Journal*, 67, 332-343. doi: 10.1111/idj.12317

Li, J. S., Xie, Y. F., Song, L. T., Wang, X. P., & Jiang S. Y. (2018). Expression profile of long non-coding RNA in gingival tissues from the patients with aggressive periodontitis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi = Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi = Chinese Journal of Stomatology*, 53, 635-639. doi: 10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2018. [in Chinese]

Lou, Y., Peng, X., Duan, D., Liu, C., Xu, X., & Zhou X. (2018) Epigenetic Regulations in the Pathogenesis of Periodontitis. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 13, 144-150. doi: 10.2174/1574888X12666170718161740

Mantel, N., & Haenszel, W. (1959). Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *Journal of the National Cancer Institute*, 22, 719-748. doi: 10.1093/jnci/22.4.719

Mira, A., Simon-Soro, A., & Curtis, M. A., Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *Journal of Clinical Periodontology*, 44, S23-S38. doi: 10.1111/jcpe.12671

Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., PRISMA Group. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Annals of Internal Medicine*, 151, 264-269. doi: 10.7326/0003-4819-151-4-200908180-00135

Nazir, M. A., (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences*, 11, 72-80.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. (2018). Available in: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1333048#frequency_tab

Nibali, L. (2013). Suggested guidelines for systematic reviews of periodontal genetic association studies. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, 735-756. doi: 10.1111/jcpe.12128

Nuzzo, R. (2014). Statistical errors: P values, the gold standart of statistical validity, are not realiable as many scientists assume. *Nature*, 506, 150-153.

Pasmant, E., Sabbagh, A., Vidaud, M., & Bièche, I. (2011). Anril, a long, nocoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25, 444-448. doi: 10.1096/fj.10-172452

Preshaw, P. M., & Taylor, J. J. (2011). How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis?. *Journal of Clinical Periodontology*, 38, 60-84. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01671.x

Rezazadeh, M., Gharesouran J., Moradi, M., Noroozi, R., Omrani M. D., Taheri, M., & Ghafouri-Fard, S. (2018). Association study of ANRIL genetic variants and multiple sclerosis. *Journal of Molecular Neuroscience*, 65, 54-59. doi: 10.1007/s12031-018-1069-3

Schaefer, A. S. (2018). Genetics of periodontitis: Discovery, biology, and clinical impact. *Periodontology*, 78, 162-173. doi: 10.1111/prd.12232

Schaefer, A. S., Bochenek, G., Manke, T., Nothnagel, M., Graetz, C., Thien, A., Jockel-Schneider, Y., Harks, I., Staufienbiel, I., Wijmenga, C., Eberhard, J., Guzeldemir-Akcakanat, E., Cine, N., Folwaczny, M., Noack, B., Meyle, J., Eickholz, P., Trombelli, L., Scapoli, C., Nohutcu, R., Bruckmann, C., Doerfer, C., Jepsen, S., Loos, B. G., & Schreiber, S. (2013). Validation of reported genetic risk factors for periodontitis in a large-scale replication study. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, 536-572. doi: 10.1111/jcpe.12092

Schaefer, A. S., Richter, G. M., Dommisch, H., Reinartz, M., Nothnagel, M., Noack, B., Laine, M. L., Folwaczny, M., Groessner-Schreiber, B., Loos, B. G., Jepsen, S., & Schreiber, S. (2011). CDKN2BAS is associated with periodontitis in different European populations and is activated by bacterial infection. *Journal of Medical Genetics*, 48, 38-47. doi: 10.1136/jmg.2010.078998

Schaefer, A. S., Richter, G. M., Groessner-Schreiber, B., Noack, B., Nothnagel, M., El Mokhtari, N. E., Loos, B. G., Jepsen, S., & Schreiber, S. (2009). Identification of a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis. *PLoS Genetics*, 5, e1000379. doi: 10.1371/journal.pgen.1000378

Silva, F. R. P., Pessoa, L. D. S., Vasconcelos A. C. C. G., Lima, W. A., Alves, E. H. P., & Vasconcelos, D. F. P. (2017). Polymorphisms in interleukins 17A and 17F gene and periodontitis: results from a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, 44, 443-453. doi: 10.1007/s11033-017-4128-x

Silva, F. R. P., Vasconcelos A. C. C. G., França, L. F. C., Lenardo, D., Nascimento, H. M. S., & Vasconcelos, D. F. P. (2018) Association between the rs1143634 polymorphism in interleukin-1B and chronic periodontitis: results from a meta-analysis

composed by 54 case/control studies. *Gene*, 668, 97-106. doi: 10.1016/j.gene.2018.05.067

Silva, F. R. P., Vasconcelos, A. C. C. G., França, L. F. C., Lenardo, D., Rodrigues, L. S., Nascimento, M. L. L. B., & Vasconcelos, D. F. P. (2017). Relationship between-889 C/T polymorphism in interleukin-1A gene and risk of chronic periodontitis: evidence from a meta-analysis with new published findings. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 22, e7-e14. doi: 10.4317/medoral.21233

Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., Hernández, M., & Gamonal, J. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*, 23, 329-355. doi: 10.1590/1678-775720140259

Song, C. L., Wang, J. P., Xue, X., Liu, N., Zhang, X. H., Zhao, Z., Liu, J. G., Zhang, C. P., Piao, Z. H., Liu, Y., & Yang, Y. B. (2017). Effect of circular ANRIL on the inflammatory response of vascular endothelial cells in a rat model of coronary atherosclerosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42, 1202-1212. doi: 10.1159/000478918

Susin, C., Haas, A. N., & Albandar, J. M. (2014). Epidemiology and demographics of aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 65, 27-45. doi: 10.1111/prd.12019

Taheri, M., Pouresmaeili, F., Omrani, M. D., Habibi, M., Sarrafzadeh, S., Noroozi, R., Rakhshan, A., Sayad, A., & Ghafouri-Fard, S. (2017). Association of ANRIL gene polymorphisms with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in an Iranian population. *Biomarkers in Medicine*, 11, 413-422. doi: 10.2217/bmm-2016-0378

Taiete, T., Casati, M. Z., Stolf, C. S., Corrêa, M. G., Santamaria, M. P., Andere, N. M. R. B., Coletta, R. D., Sallum, E. A., Júnior, F. H. N., Silvério, K. G., & Casarin, R. C. V. (2018). Validation of reported GLT6D1 (rs1537415), IL10 (rs6667202), and ANRIL (rs1333048) single nucleotide polymorphisms for aggressive periodontitis in a Brazilian population. *Journal of Periodontology*, 90, 44-51. doi: 10.1002/JPER.18-007

Teeuw, W. J., Laine, M. L., Bizzarro, S., & Loos, B. G. (2015). A lead ANRIL polymorphism is associated with elevated CRP levels in periodontitis: a pilot case-control study. *PloS One*, 10, e0137335. doi: 10.1371/journal.pone.0137335

Wang, H., Liu, Y., Zhong, J., Wu, C., Zhong, Y., Yang, G., Zhang, J., & Tang, A. (2018). Long noncoding RNA ANRIL as a novel biomarker of lymph node metastasis and prognosis in human cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, 9, 14608. doi: 10.18632/oncotarget.21825

Xu, B., Fang, Z., He, S., Wang, J., & Yang, X. (2018). ANRIL polymorphism rs4977574 is associated with increased risk of coronary artery disease in Asian populations: a meta-analysis of 12,005 subjects. *Medicine*, 97, e12641. doi: 10.1097/MD.00000000000012641

Yang, S-L., & Huang, S-J. (2019). Interleukin-10 polymorphisms (rs1800871, rs1800872 and 1800896) and periodontitis risk: A meta-analysis. *Archives of Oral Biology*, 97, 59-66. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.10.012

Yu, G., Liu, G., Yuan, D., Dai, J., Cui, Y., & Tang, X. (2018). Long non-coding RNA ANRIL is associated with a poor prognosis of osteosarcoma and promotes tumorigenesis via PI3K/Akt pathway. *Journal of Bone Oncology*, 11, 51-55. doi: 10.1016/j.jbo.2018.02.002

Zeggini, E., Weedon, M. N., Lindgren, C. M., Frayling, T. M., Elliott, K. S., Lango, H., Timpson, N. J., Perry, J. R., Rayner, N. W., Freathy, R. M., Barrett, J. C., Shields, B., Morris, A. P., Ellard, S., Groves, C. J., Harries, L. W., Marchini, J. L., Owen, K. R., Knight, B., Cardon, L. R., Walker, M., Hitman, G. A., Morris, A. D., Doney, A. S., Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), McCarthy, M. I., & Hattersley, A. T. (2007). Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science (New York, N.Y.)*, 316, 1336-1341. doi: 10.1126/science.1142364

Zhou, X., Zhang, W., Liu, X., Zhang, W., & Li, Y. (2015). Interrelationship between diabetes and periodontitis: Role of hyperlipidemia. *Archives of Oral Biology*, 60, 667-674. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.11.008

Zou, Y., Li, C., Shu, F., Tian, Z., Xu, W., Xu, H., Tian, H., Shi, R., & Mao, X. (2015). lncRNA expression signatures in periodontitis revealed by microarray: the potential role of lncRNAs in periodontitis pathogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116, 640-647. doi: 10.1002/jcb.25015

5 CAPÍTULO IV

5.1 Artigo III

Polimorfismos, interleucinas e periodontite crônica: uma abordagem Bayesiana

^{1,4}Silva FRP, ²Vasconcelos DFP, ³Shin JI, ²Pessoa LS, ⁵Carvalho MD, ⁴Koga RS, ^{1,4}Barcellos JFM.

¹ Aluno de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil;

² Laboratório de Análise e Processamento Histológico da Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil.

³ Departamento de Pediatria, Colegio de Medicina de Yonsei, Seul, República da Coreia.

⁴ Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

⁵ Departamento de Periodontia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

Autor correspondente: Felipe Rodolfo Pereira da Silva

Email: feliperodolfo.15@hotmail.com.

Endereço postal: Departamento de Morfologia, Avenida General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroadó, Manaus, Amazonas, CEP: 69067-005. Número de telefone: +5592992873755.

Resumo

A periodontite é uma doença de elevada prevalência dentro da clínica odontológica. Variações genéticas em genes de interleucinas (IL) foram associados à periodontite crônica (CP) e foram foco de diversas metanálises. Este estudo objetivou medir a notoriedade nas metanálises por meio de uma abordagem Bayesiana para determinar possíveis associações falso-positivas. Uma busca sistemática foi realizada para metanálises com associação entre polimorfismos em genes de IL e CP. Os cálculos da taxa de probabilidade falso-positiva (FPRP) e a probabilidade bayesiana de falsa descoberta (BFDP) foram realizados para detectar a notoriedade com o poder estatístico de 1,2 e 1,5 de *Odds Ratio* (OR) a probabilidade primária de 10^{-3} e 10^{-6} . Como resultados oito metanálises abordando os polimorfismos IL 1A/rs1800587, 1B/rs1143634, 1RN/rs2234663, 4/rs2243250, 6/rs1800795/rs1800796, 17A/rs2275913 e 18/rs1946518/rs187238 foram identificados. 22 de 270 cálculos (8.15%) mostraram-se “dignos de nota”. Assim, identificamos que os polimorfismos nas IL1A e 1B são notórios biomarcadores para a susceptibilidade para CP.

Palavras chave: alelos, variações genéticas, doenças periodontais, fatores de risco, Odds Ratio.

Introdução

As doenças periodontais são condições orais que compreendem todas as doenças inflamatórias da gengiva com perda de inserção, destruição dos tecidos periodontais e possível perda dental. Embora suas antigas formas clínicas tenham sido dissolvidas por uma recente classificação de diagnóstico (CATON et al., 2018), a doença era classificada, comumente, como periodontite crônica ou agressiva (CP e AgP, respectivamente). A elevada prevalência da periodontite observada ao redor do mundo está de acordo com o detectado em diversos países da América Latina (OPPERMANN et al., 2015) e bem como nos Estados Unidos em que a periodontite foi detectada em 42% dos adultos com 30 anos ou mais (EKE et al., 2018).

Dentro da resposta imune do hospedeiro que contribui com o dano periodontal, tem-se as interleucinas (IL's) como moléculas chave. A IL-1A, 1B, 1RN, 6, 10, 17 e 18 são as IL's mais estudadas em que os autores objetivam verificar o papel do aumento ou diminuição dos níveis destas citocinas e a associação com a periodontite (BANU et al., 2018; MOURA et al., 2017).

Outro fator que também recebe considerável atenção na literatura é a relação entre variações genéticas nos genes de IL's e o risco de CP. Desses estudos, um elevado número tem focado em determinar o impacto de variações genéticas em IL's e a periodontite, muitas dessas avaliações realizadas por meio de metanálises (SILVA et al., 2017; YAN et al., 2014; ZHU et al., 2016). Contudo, a metanálise tem uma importante limitação que os autores denominam como taxa de falso positivo em que eles propõem métodos para resolver essa questão (MAJUMDAR et al., 2018).

Visto o aumento no número de publicações com metanálise sobre variações nos genes de IL's e periodontite, este estudo objetiva determinar a taxa de falsos positivos em dados de metanálises publicadas sobre polimorfismos em genes de IL's e CP por duas abordagens estatísticas: A taxa de probabilidade falso-positiva (FPRP) e a probabilidade Bayesiana de falsa descoberta (BFDP).

Métodos

Busca sistemática

Uma busca sistemática para estudos publicados anteriormente a 3 de Setembro de 2019 nas bases de dados médicos e científicos *Google Scholar* e *Pubmed* foi realizada com a seguinte combinação de palavras-chave: (*interleukin* ou *cytokine*) e

(*genetic variation* ou *polymorphism*) e (*periodontal disease* ou *chronic periodontitis*) e (meta-analysis) para coleta de estudos que iriam compor a metanálise bayesiana.

Não houve restrição de linguagem na estratégia de busca e todas as citações foram analisadas para identificação de possíveis estudos adicionais.

Processo de coleta de dados

Dois investigadores independentemente revisaram todos os estudos e extraíram os dados seguindo formulário padronizado que compôs a tabela de característica dos estudos de metanálise.

Avaliação de risco de viés pelo critério de Veneza

Por meio do critério de Veneza (IOANNIDIS et al., 2008) foi realizada a avaliação da credibilidade dos estudos identificados e inclusos na metanálise de abordagem bayesiana. Resumidamente, as notas A, B e C foram atribuídas ao nível de credibilidade classificado como forte, moderado ou fraco, respectivamente. Para tal classificação foram utilizadas as categorias:

- [1] Total de evidência, dado dependente do tamanho amostral e avaliado pela soma dos casos e controles utilizados pelos estudos para expressar o alelo de risco. As notas A, B e C foram atribuídas para somas >1000, entre 100 e 1000 e <100, respectivamente;
- [2] Replicação da associação encontrada avaliada pelo nível de I^2 em que as notas A, B e C foram atribuídas para valores de $I^2 < 25\%$, $25-50\%$ e $> 50\%$, respectivamente;
- [3] Proteção de viés, em que a nota A foi atribuída ao estudo sem risco de viés de publicação ou que este risco fosse improvável de interferir na associação relatada, a nota B atribuída à provável mas não detectada presença de viés relatado no estudo e a nota C se algum viés tivesse sido detectado no estudo. A magnitude de associação também foi avaliada para se considerar a presença de viés de proteção e assim, a nota C foi atribuída a associação com valor de $OR < 1,15$.

Utilizando tais critérios, o nível de credibilidade do estudos foi definido com alto (notas A apenas), intermediário (notas A e B, apenas) e baixo (ao menos uma nota C).

Análise estatística

Para verificar a veracidade das evidências disponíveis nas metanálises coletadas, foram utilizados duas abordagens bayesianas: FRPR (*False-Positive Report Probability*) e BDFP (*Bayesian False Discovery Probability*).

Primeiramente, o teste FRPR avalia a probabilidade de uma associação não verdadeira entre o fator e a doença (WACHOLDER et al., 2004). Este dado pode ser obtido por meio dos seguintes parâmetros: [1] π , variável indicativa a probabilidade prévia de uma associação verdadeira; [2] o menor α , o qual o teste é “fidedigno” ou o valor de p observado; [3] $(1-\beta)$, sendo este o poder estatístico no qual a descoberta é definido como digna de nota ao se rejeitar a hipótese nula. Para cálculo do FRPR utiliza-se a seguinte equação:

$$FPRP = \alpha (1 - \pi) / \{ \alpha (1 - \pi) + (1 - \beta) \}$$

α pode ser substituído pelo valor de p observado e $(1 - \beta)$ é obtido por meio da seguinte equação em que se assume que a estimativa do risco relativo (RR) é baseada numa distribuição normal o qual a variação é igual a σ^2 (WACHOLDER et al., 2004):

$$1 - \beta = \Phi [\{ \log(RR_A / RR_0) \} / \sigma] - Z_{\alpha/2}$$

Φ demonstra a função distribuição acumulativa do desvio normal, σ e $Z_{\alpha/2}$ podem ser substituídos pelo erro padrão do logaritmo estimado do valor de OR e do valor bilateral de p da distribuição normal (WACHOLDER et al., 2004). No presente estudo dois específicos valores para probabilidade prévia foram usados (10^{-3} e 10^{-6}) que podem ser respectivamente aproximados ao valor esperado de estimativa para cada gene candidato ou gene aleatório. Neste caso, permite-se aos leitores formularem seu próprio julgamento a partir das evidências dadas para cada variante gênica.

Walcholder et al., (2004) sugeriram três valores de OR (1,2, 1,5 e 2,0) que podem ser pensados para validar um achado fidedigno. Considerando os resultados de OR organizados para este estudo, em que o valor médio aproximado está entre 1,2 e 1,5, ambos estes valores foram escolhidos.

Após, o cálculo de BFDP, proposto por Wakefield et al., (2007), foi realizado para esclarecer a fidedignidade das evidências reportadas. Este dado concede uma descrição da fidedignidade por meio do custo de uma falsa descoberta e uma falsa não descoberta com um viés metodológico enquanto se utiliza mais informações que o FRPR.

De acordo com a literatura, o nível de significância para o cálculo e BFDP é determinado no valor de $p = 0,8$, valor este derivado da afirmativa de que uma falsa não descoberta é quatro vezes mais dispendiosa que uma falsa descoberta. BDFP é determinado pela seguinte equação:

$$\text{BFDP} = (\text{ABF} \times \text{PO}) / (\text{ABF} \times \text{PO} + 1) \text{ [I]}$$

$$\text{PO} = \pi_0 / (1 - \pi_0) \text{ [II]}$$

PO é a chance de probabilidade prévia de uma não associação, e ABF é o fator Bayesiano aproximado que pode ser deduzido por meio dos valores de OR e erro padrão. Semelhantemente, BFDP foi calculado baseado em ambas as probabilidades prévias como o FRPR (10^{-3} e 10^{-6})

Embora os possíveis vieses propostos tenham sido removidos, assume-se que uma parte das variantes genéticas não está verdadeiramente associada à doença, apesar da significância estatística descrita como valor de $p < 0,05$. Portanto, as abordagens Bayesianas são úteis para evitar a interpretação superestimada dos resultados.

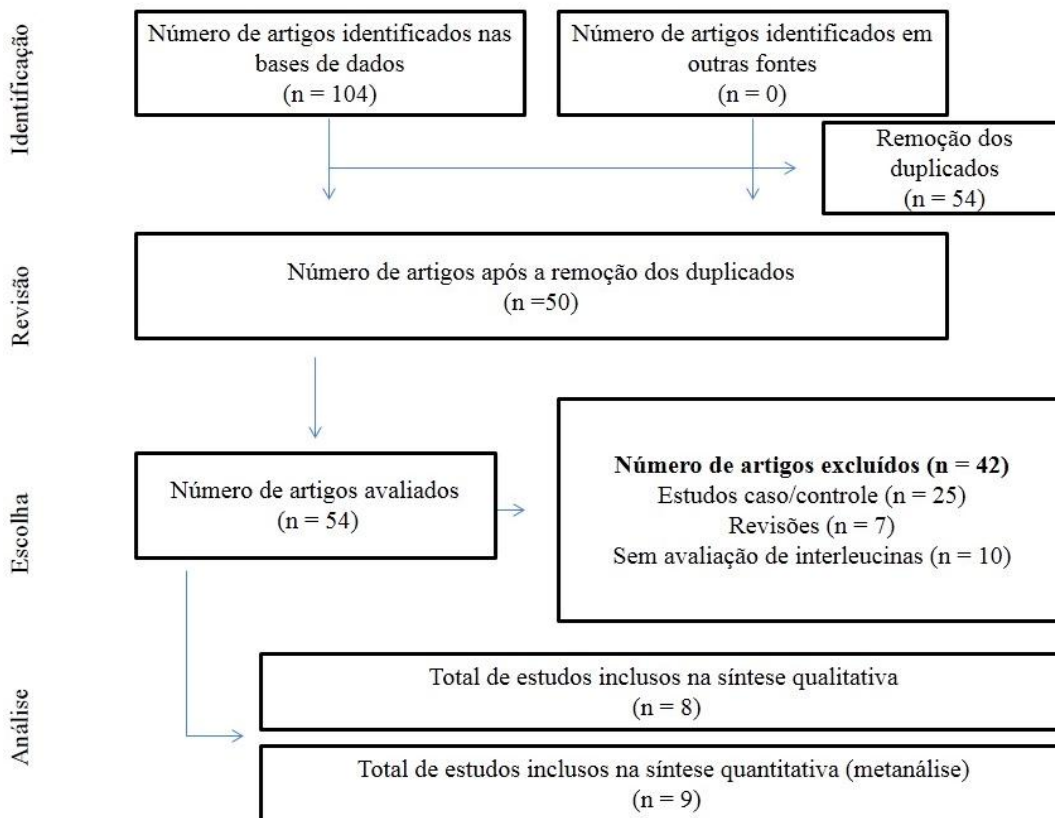
Análises adicionais

Por meio dos nomes dos genes incluídos na metanálise Bayesiana com os SNP's de associação que foram estatisticamente significativas nas metanálises, uma rede genética da base de dados GeneMania (versão 3.3) e uma rede proteica obtida da base de dados STRING10.5 foram montadas com o *score* mínimo de 0,7 o qual não houve mais que cinco interações mostradas na imagem.

Resultados

A busca inicial resultou em 104 estudos dentro das duas bases de dados usadas, após a remoção dos duplicados e análise dos estudos, oito artigos com nove estudos foram inclusos (Figura 1). Nos achados gerais, oito apresentaram resultado significativamente estatístico com valor de $P < 0,05$) em ao menos uma comparação alélica ou genotípica para a avaliação geral ou estratificada (DING et al., 2012; LI et al., 2014; MAO et al., 2013; SILVA et al., 2017; SILVA et al., 2018; SONG et al., 2013. YAN et al., 2014; ZHU et al., 2016). Como mostrado na tabela 1, nove variações genéticas em sete genes de interleucinas foram abordados nas metanálises (IL-1A/rs1800587, IL-1B/rs1143634, IL-1RN/rs2234663, IL-4/rs2243250, IL-6/rs1800796/rs1800795, IL-17A/rs2275913 e IL-18/rs1946518/rs187238). Os resultados significativos nas metanálises foram obtidos na observação de diversos grupos étnicos com diferentes combinações alélicas ou genotípicas [Caucasianos ($n = 2$), Asiáticos ($n = 3$) e População Miscigenada ou Brasileira ($n = 2$)]. Uma avaliação significativa foi realizada em brancos; contudo, a exata etnia desses sujeitos não foi totalmente esclarecida.

Figura 1. Fluxograma de seleção dos estudos de metanálise inclusos.



45 comparações com significativo valor de P foram incluídos nas análises em sete diferentes genes de IL. Os resultados estão compostos por cinco comparações para a 1A/rs1800587, dezoito para a IL-1B/rs1143634, sete para a IL-1RN/rs2234663, dois para a IL-4/rs2243250, dois para a IL-6/rs1800796, três para a IL-6rs1800795, quatro para a IL-17A/rs2275913 e dois para a IL-18 (rs1946518 e rs187238).

No geral, de 176 valores (66,2%) para FPRP e 90 (33,8%) para BDFP, 40 (15,03%) mostraram-se “dignas de nota” (tabela 1). Os cálculos de FPRP sobre os polimorfismos na IL-6 não foram possíveis devido limitação estatística. Os resultados estatísticos evidenciaram que apenas os dados das metanálises sobre os polimorfismos na IL-1A e 1B foram “dignos de nota” (<0,02 para FPRP e <0,08 para BDFP). Sete (2,6%) e uma (0,4%) das comparações mostraram notoriedade aos valores de 10^{-3} e 10^{-6} , respectivamente, com poder estatístico de detecção do valor de OR na probabilidade primária de 1,2. Por outro lado, nos valores de 10^{-3} e 10^{-6} com o poder estatístico e detecção do valor de OR na probabilidade primária de 1,5, houveram 11 (4,1%) e cinco (1,9%) comparações que foram “dignas de nota”. Os dados sobre BDFP mostraram que 10 (3,7%) comparações mostraram-se fidedignas no valor de 10^{-3} e quatro (1,5%) no valor de 10^{-6} .

A avaliação de qualidade metodológica é apresentada na tabela 2 e mostra que todas as metanálises apresentaram grau A de qualidade sobre o Total de Evidência, exceto para o estudo realizado por Silva et al. (2017) sobre o polimorfismo na IL-17A. Quando observadas outras categorias, houve um perfil heterogêneo de graus nos estudos. A rede gene-gene mostrou que as IL-1A e 1B, ambos os genes com notoriedade, estão no papel central da co-expressão entre as interleucinas foco das metanálises, e em associação com seus receptores e outras moléculas participantes do processo inflamatório (Figura 2). Estas ambas IL's também estão na posição central da rede proteína-proteína, reforçando suas participações na resposta inflamatória (Figure 3).

Discussão

Até o presente momento, esta é a primeira metanálise usando métodos Bayesianos para avaliar dados de metanálises sobre polimorfismos em genes de IL's e CP, Revisões sistemáticas e metanálises em estudos genéticos são uma fonte de dados confiáveis pela combinação dos resultados disponíveis na literatura trazendo novos e robustos achados. Contudo, uma importante falha que pode ser apontada na interpretação de metanálises é o valor de P como limiar de confiança.

Quando os autores e leitores tomam o valor de P, somente, como um ponto de acurácia diversos dados podem se tornar falso-positivos devido a limitação estatística que também pode influenciar o valor de P e portanto, este possível índice não é tão confiável como a comunidade científica considera (NUZZO 2014).

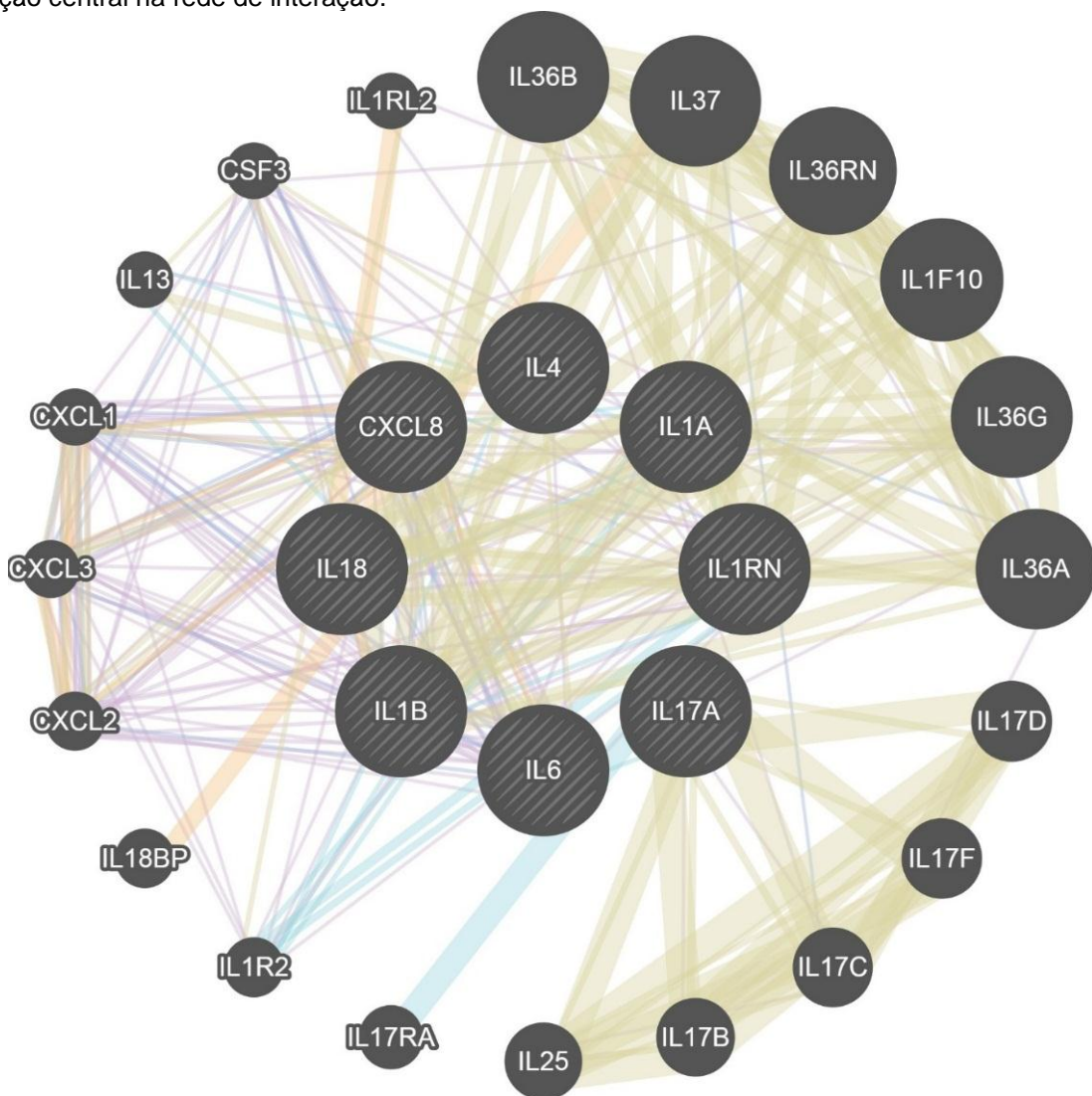
De fato, um achado estatisticamente significativo não depende apenas de um valor significativo de P, mas também da probabilidade primária de que a associação entre o polimorfismo genético e a alteração fenotípica seja real e do poder estatístico do teste aplicado (WACHOLDER 2004). Para verificar a possibilidade de dados falso-positivos em metanálises e estudos de associação genômica, os cálculos de FPRP e BDFP foram desenvolvidos.

Tabela 1. Resultados de metanálises com significância estatística para CP em que as variantes com valores dignos de nota estão em negrito.

Gene/Variante	Avaliação	Alelo raro/ Comparação	OR (95% IC)	P para metanálise	Estudos (n)	Diagnóstico (subtipos clínicos)	No. de Casos/Controles	I ² (%)	I ² (P)	Valor de P Egger	OR 1,2	OR 1,5	Valor de FPRP				BFDP 0,001	BFDP 0,00001	Autor, Ano
													OR 1,2		OR 1,5				
													0,001	0,00001	0,001	0,00001			
IL-1A rs1800587	Geral	T vs C	1,29 (1,15 – 1,44)	<0,001	23	CP	2122/1794	43	NA	0,64	0,099	0,996	0,055	0,983	0,006	0,851	0,207	0,996	Mao et al., 2013
		TT vs CC	1,59 (1,22 – 2,07)	0,0005	23	CP	2122/1794	13	NA	NA	0,018	0,333	0,969	1,000	0,631	0,999	0,966	1,000	Mao et al., 2013
		CT vs CC	1,30 (1,12 – 1,51)	0,0004	23	CP	2122/1794	42	NA	NA	0,147	0,969	0,801	1,000	0,380	0,998	0,941	1,000	Mao et al., 2013
		CT+TT vs CC	1,40 (1,21 – 1,61)	<0,001	23	CP	2122/1794	39	NA	NA	0,015	0,833	0,134	0,994	0,003	0,740	0,128	0,993	Mao et al., 2013
		TT vs CT+CC	1,47 (1,16 – 1,87)	0,002	23	CP	2122/1794	14	NA	NA	0,049	0,565	0,972	1,000	0,751	1,000	0,981	1,000	Mao et al., 2013
IL-1B rs1143634	Geral	T vs C	1,35 (1,24 – 1,48)	<0,00001	54	CP	4924/4452	27	0,06	0,236	0,006	0,988	0,000	0,026	0,000	0,000	0,000	0,016	Silva et al., 2018
		C vs T	0,72 (0,68 – 0,81)	<0,00001	54	CP	4924/4452	27	0,06	NA	0,007	0,900	0,006	0,860	0,000	0,049	0,004	0,788	Silva et al., 2018
		TT vs CC	1,70 (1,42 – 2,03)	<0,00001	54	CP	4924/4452	13	0,24	NA	0,000	0,083	0,071	0,987	0,000	0,052	0,001	0,576	Silva et al., 2018
		CC vs TT	0,77 (0,70 – 0,85)	<0,0001	54	CP	4924/4452	20	0,12	NA	0,059	0,998	0,004	0,789	0,000	0,180	0,013	0,930	Silva et al., 2018
		TT vs CT+CC	1,39 (1,19 – 1,63)	<0,0001	54	CP	4924/4452	19	0,14	NA	0,035	0,826	0,590	0,999	0,058	0,984	0,690	1,000	Silva et al., 2018
	Caucasianos	T vs C	1,25 (1,10 – 1,43)	0,0009	21	CP	1712/1603	27	0,14	NA	0,276	0,996	0,806	1,000	0,536	0,999	0,964	1,000	Silva et al., 2018
		C vs T	0,80 (0,70 – 0,91)	0,009	21	CP	1712/1603	27	0,14	NA	0,267	0,997	0,720	1,000	0,408	0,999	0,946	1,000	Silva et al., 2018
		TT vs CC	1,79 (1,36 – 2,37)	<0,0001	21	CP	1712/1603	4	0,40	NA	0,003	0,109	0,948	1,000	0,306	0,998	0,868	1,000	Silva et al., 2018
		CC vs TT	0,56 (0,42 – 0,73)	<0,0001	21	CP	1712/1603	4	0,40	NA	0,002	0,099	0,917	1,000	0,155	0,995	0,745	1,000	Silva et al., 2018
		TT vs CT+CC	1,63 (1,25 – 2,12)	0,0003	21	CP	1712/1603	6	0,38	NA	0,011	0,268	0,960	1,000	0,501	0,999	0,945	1,000	Silva et al., 2018
	Asiáticos	T vs C	1,65 (1,40 – 1,94)	<0,00001	22	CP	2138/1753	31	0,11	NA	0,000	0,124	0,023	0,959	0,000	0,011	0,000	0,261	Silva et al., 2018
		C vs T	0,78 (0,69 – 0,88)	<0,0001	22	CP	2138/1753	31	0,11	NA	0,141	0,995	0,277	0,997	0,052	0,982	0,663	0,999	Silva et al., 2018
		CT vs TT+CC	1,41 (1,21 – 1,64)	<0,0001	22	CP	2138/1753	13	0,65	NA	0,018	0,789	0,313	0,998	0,010	0,913	0,318	0,998	Silva et al., 2018
		T vs C	1,27 (1,09 – 1,49)	0,002	9	CP	923/963	49	0,07	NA	0,243	0,979	0,932	1,000	0,774	1,000	0,985	1,000	Silva et al., 2018
		C vs T	0,79 (0,67 – 0,92)	0,002	9	CP	923/963	49	0,07	NA	0,246	0,986	0,908	1,000	0,711	1,000	0,981	1,000	Silva et al., 2018
Miscigenada	TT vs CC	1,45 (1,06 – 1,98)	0,02	9	CP	923/963	0	0,57	NA	0,117	0,584	0,994	1,000	0,971	1,000	0,997	1,000	Silva et al., 2018	
	CC vs TT	0,69 (0,50 – 0,94)	0,02	9	CP	923/963	0	0,57	NA	0,116	0,586	0,994	1,000	0,970	1,000	0,997	1,000	Silva et al., 2018	
	TT vs CT+CC	1,40 (1,05 – 1,86)	0,02	9	CP	923/963	0	0,58	NA	0,144	0,683	0,993	1,000	0,967	1,000	0,997	1,000	Silva et al., 2018	
	2 allele vs L allele	1,50 (1,02 – 2,20)	0,04	12	CP	1331/1223	NA	<0,0005	0,20	0,127	0,500	0,997	1,000	0,987	1,000	0,998	1,000	Ding et al., 2012	
Geral	2 allele vs L allele	2,17 (1,17 – 4,01)	0,01	7	Severe CP	389/580	NA	<0,005	NA	0,029	0,119	0,998	1,000	0,991	1,000	0,998	1,000	Ding et al., 2012	
	22 vs LL	1,47 (1,00 – 2,18)	0,05	9	CP	1012/1022	NA	0,13	0,12	0,156	0,540	0,997	1,000	0,990	1,000	0,998	1,000	Ding et al., 2012	
	22 vs LL	4,02 (1,84 – 8,80)	<0,0005	6	Severe CP	350/560	NA	0,29	NA	0,001	0,007	0,998	1,000	0,987	1,000	0,997	1,000	Ding et al., 2012	
	2 allele vs L allele	1,82 (1,31 – 2,54)	<0,0005	4	CP	420/383	NA	0,19	NA	0,007	0,128	0,984	1,000	0,771	1,000	0,975	1,000	Ding et al., 2012	
	L2 vs LL	2,13 (1,44 – 3,16)	<0,0005	3	CP	311/363	NA	0,14	NA	0,002	0,041	0,987	1,000	0,808	1,000	0,974	1,000	Ding et al., 2012	
IL-4 rs2243250	Branços	L2 + 22 vs LL	2,12 (1,44 – 3,11)	<0,0005	3	CP	311/363	NA	0,13	NA	0,002	0,038	0,985	1,000	0,759	1,000	0,967	1,000	Ding et al., 2012
		T vs C	1,2 (1,02 – 1,42)	0,03	9	P	769/1,032	9,2	0,36	NA	0,500	0,995	0,985	1,000	0,971	1,000	0,997	1,000	Yan et al., 2014
		TT vs CC	1,68 (1,05 – 2,67)	0,03	8	P	647/786	0	0,98	NA	0,077	0,316	0,997	1,000	0,989	1,000	0,998	1,000	Yan et al., 2014
IL-6 rs1800795	Geral	G VS C	1,58 (1,03 – 2,44)	0,0036	6	CP	843/640	77,7	<0,001	NA	0,107	0,407	0,997	1,000	0,990	1,000	0,998	1,000	Song et al., 2013
		GG vs GC + CC	2,38 (1,37 – 4,14)	0,002	6	CP	843/640	7,3	0,37	NA	0,008	0,051	0,996	1,000	0,977	1,000	0,996	1,000	Song et al., 2013
IL-6 rs1800796	Asiáticos	CC + GC vs GG	2,692 (2,160–3,354)	0,000	4	CP	2422/3373	0,0	0,830	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,000	0,000	Zhu et al., 2016	
		GC vs GG	0,62 (0,44 – 0,87)	0,007	5	CP	2422/3373	6,1	0,37	NA	0,044	0,337	0,992	1,000	0,944	1,000	0,994	1,000	Zhu et al., 2016
IL-17A rs2275913	Brasileiros	GC VS GG	0,75(0,577–0,980)	0,035	4	CP	2422/3373	55,7	0,080	NA	0,220	0,806	0,994	1,000	0,977	1,000	0,997	1,000	Zhu et al., 2016
		Caucasianos	AA vs GG	0,58 (0,38 – 0,89)	0,01	5	CP	411/396	NA	NA	NA	0,049	0,262	0,996	1,000	0,980	1,000	0,997	1,000
IL-18 rs1946518	Geral	GG vs AA	1,73 (1,13 – 2,65)	0,01	5	CP	411/396	NA	NA	NA	0,046	0,256	0,996	1,000	0,979	1,000	0,997	1,000	Silva et al., 2017
		GG vs GA+AA	1,60 (1,06 – 2,39)	0,02	5	CP	411/396	NA	NA	NA	0,080	0,376	0,996	1,000	0,983	1,000	0,997	1,000	Silva et al., 2017
		GA vs GG+AA	0,86 (0,65 – 1,15)	0,32	5	CP	411/396	NA	NA	NA	0,584	0,957	0,998	1,000	0,997	1,000	0,999	1,000	Silva et al., 2017
		C vs A	1,86 (1,30 – 2,65)	0,001	9	CP	576/458	NA	NA	NA	0,008	0,117	0,987	1,000	0,835	1,000	0,982	1,000	Li et al., 2014
IL-18 rs187238	Geral	AA vs AC+CC	2,64 (1,34 – 5,21)	0,005	9	CP	576/458	NA	NA	NA	0,012	0,052	0,998	1,000	0,990	1,000	0,998	1,000	Li et al., 2014
		C vs G	1,47 (1,13 – 1,91)	0,004	9	CP	576/458	NA	NA	NA	0,064	0,560	0,984	1,000	0,875	1,000	0,990	1,000	Li et al., 2014
		GG vs GC+CC	1,66 (1,21 – 2,29)	0,002	9	CP	576/458	NA	NA	NA	0,024	0,268	0,988	1,000	0,882	1,000	0,989	1,000	Li et al., 2014

Tabela 2. Resultados da avaliação pelo critério de Veneza das metanálises incluídas nesse estudo.

IL	Polimorfismo	Autor (ano)	Total de evidência	Replicação	Proteção para viés
1A	rs1800587	Mao (2013)	A	B	C
1B	rs1143634	Silva (2018)	A	B	A
1RN	rs2234663	Ding (2012)	A	C	B
4	rs2243250	Yan (2014)	A	B	B
6	rs1800796	Zhu (2016)	A	B	B
	rs1800795	Song (2013)	A	B	B
17A	rs2275913	Silva (2017)	B	B	B
18	rs1946518	Li (2014)	A	B	B
	rs187238		A	B	B

Figura 2. Rede gene-gene formada entre os genes de interleucinas o qual a IL-1A e IL-1B estão em posição central na rede de interação.

Legenda: IL – Interleucina; CXCL – Ligante de quimiocina; CSF – Fator de estimulação de crescimento; **Linhas douradas** – Nível de co-expressão gênica indicando a semelhança no nível de expressão caso dois genes estejam ligados; **Linhas roxas** – Nível de interação proteica em que dois produtos gênicos estão vinculados; **Linhas azul claro** – Conexão entre genes que participam da mesma reação num mecanismo biológico; **Linhas laranjas** – Semelhança da ação dos genes em outros organismos observada por meio de ortologia; **Linhas azul escuro** – Conexão entre genes expressos no mesmo tecido ou órgão.

Nossos resultados incluem oito metanálises em diversos grupos étnicos sobre a associação entre polimorfismos nas IL-1A, 1B, 1RN, 4, 6, 8, 17A e 18 e o risco de CP. Outras importantes metanálises estão disponíveis na literatura, porém seus resultados não apresentaram-se significativos (NI et al., 2017; Zhang et al., 2018) e não puderam ser inclusos nessa avaliação. Nosso estudo objetiva medir a real significância dos resultados das metanálises anteriormente citadas. De todos os cálculos inclusos, apenas os resultados das metanálises sobre a IL-1A e 1B mostraram-se “dignos de nota”.

A IL-1A é uma interleucina relevante envolvida na resposta imune que é constitutivamente expressa em diversas células em condições fisiológicas dentro dos tecidos, o qual sua expressão aumenta na resposta a estímulos inflamatórios (DI PAOLO; SHAYAKHMETOV, 2016). Esta citocina promove aumento de receptores de adesão celular e liberação de outras citocinas que resulta na amplificação do recrutamento de neutrófilos e resistência à infecção (GARLANDA et al., 2013).

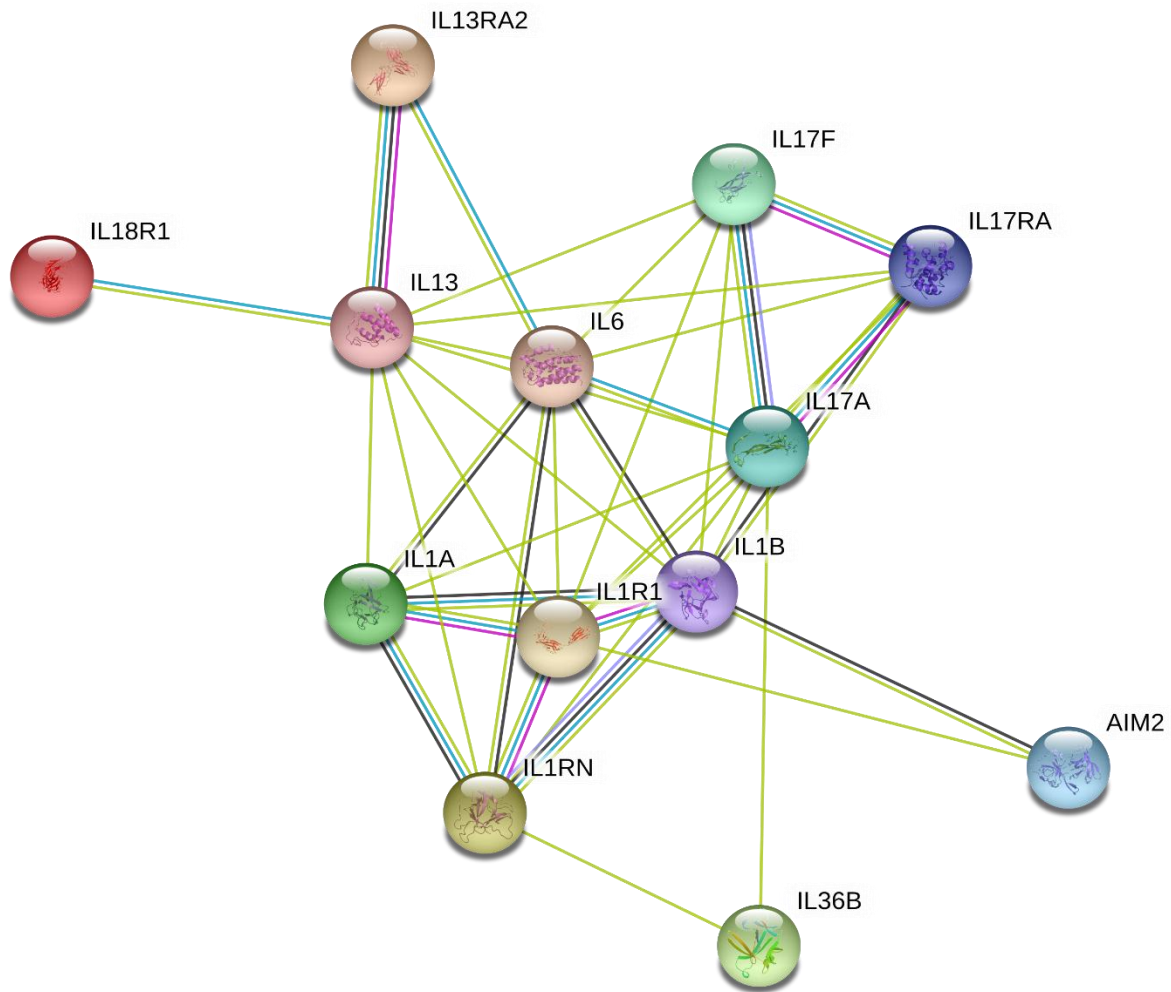
Os níveis de IL-1A foram influenciados por variações genéticas específicas em carcinoma nasofaríngeo em que o polimorfismo rs3783553 promoveu baixos níveis desta citocina em pacientes portadores do genótipo homozigoto positivo para o polimorfismo (YANG et al., 2011). Da mesma forma, o polimorfismo rs1800587 também interferiu na transcrição gênica que esteve aumentada na presença do alelo T, mas os resultados não foram significativos (BRAOSI et al., 2012).

Na periodontite, os estudos genéticos objetivam demonstrar a relação entre o polimorfismo rs1800587 e a doença por meio de estudos caso/controle (ARMIGOHAR et al., 2014; BOUKORTT et al., 2015) ou metanálises (MAO et al., 2013; SILVA et al., 2017). No presente estudo de todas as comparações realizadas por Mao et al., (2013), apenas alguns da análise geral foram estatisticamente significativos e mostraram-se “dignos de nota” (Tabela 1). Na metanálise realizada por estes autores, outras comparações baseadas em etnia foram calculadas. Contudo, não houve significância estatística e portanto não puderam ser submetidas à abordagem Bayesiana.

Como apresentado na tabela 1, bem como nas figuras 2 e 3, os resultados sobre o polimorfismo rs1800587 mostrou-se fidedigno com a IL-1A tendo papel central no processo inflamatório, respectivamente. Este polimorfismo é classificado como uma

mudança de nucleotídeo único com a alteração pontual na posição -889 (C/T) do gene. O alelo selvagem teve considerável *Minor Allele Frequency* (MAF) na população global (0,7214). Embora tal frequência elevada, o alelo mutado que foi responsável pelo aumento nos níveis de IL-1A no fluido gengival dos pacientes com periodontite (SHIRODARIA et al., 2000).

Figura 3. Rede proteína-proteína envolvendo interleucinas com genes apresentando valores fidedignos de associação com a periodontite.



Esta citocina está ligada as funções biológicas da IL-1B, outra importante molécula imune da família IL-1 que se liga ao mesmo receptor da IL-1A mas atua por mecanismo fisiopatológico distinto (GARLANDA et al., 2013). Um estudo anterior demonstrou que uma rara combinação alélica dentro do cluster gênico IL1, envolvendo o polimorfismo rs1800587 na IL-1A promoveu significativo aumento nos

níveis plasmáticos de IL-1B em pacientes duplamente positivos para o alelo mutado nesta variante genética (HULKKONEN et al., 2000).

Nossos resultados trazem dados de uma metanálise que avaliou o polimorfismo rs1143634 no gene da IL-1B e CP (SILVA et al., 2018). Os autores realizaram cálculos de 54 estudos caso/controlado em diversos grupos étnicos que foram submetidos à comparações na metanálise. A análise geral, no grupo Caucasiano e na etnia Asiática foram as comparações que se mostraram fidedignas, exceto para a população Miscigenada (tabela 1).

A etnia é um fator preponderante que influencia a distribuição de polimorfismos em genes de IL (HOFFMANN et al., 2002). De fato, existem expressivas diferenças na MAF do polimorfismo rs1143634 em diferentes populações. Em população Caucasiana da Inglaterra, o alelo T teve valor de MAF de 0,3132 enquanto que em Asiáticos de Tóquio o valor de MAF deste alelo foi de 0,0625. Essa baixa frequência do alelo T em japoneses foi demonstrada anteriormente em que o valor de MAF do alelo T no polimorfismo rs1143634 foi de 0,044 (YOSHIMURA et al., 2003).

Esta variação de frequência alélica na população asiática reflete o que é observado em estudos genéticos sobre o polimorfismo rs1143634 e o risco de periodontite. Kobayashi et al., (2007) avaliaram 100 pacientes com periodontite e 100 controles e encontrou a porcentagem de 3% para o alelo T em ambos os grupos. Nenhum paciente portando o genótipo homocigoto para este alelo foi identificado e o polimorfismo, neste estudo, não foi associado à doença ($P > 0,05$).

Na população Miscigenada, foi observada uma maior frequência do alelo T que na população Asiática (ISAZA-GÚZMAN et al., 2016). Contudo, uma associação não significativa entre este alelo e o risco de periodontite foi encontrado ($P > 0,05$). A significância estatística só foi identificada quando estes dados foram agrupados por cálculos metanalíticos e atestados por meio de abordagens Bayesianas (Tabela 1).

A metanálise sobre o polimorfismos IL-1RN/rs2234663, IL-4/rs2243250, IL-6/rs1800796, IL-6rs1800795, IL-17A/rs2275913 e IL-18/rs1946518/rs187238 não mostraram evidências de serem fidedignos. Este fato não indica a ausência da influência destes polimorfismos no risco de periodontite.

A IL-1RN é um receptor celular comum para as IL-1A e 1B (GARLANDA et al., 2013). O polimorfismo rs2234663 é uma variável repetição em *tandem* (VNTR) de 86 pares de bases que geram um curto alelo composto por duas repetições (VNTR*2) e um longo alelo com três à seis repetições (VNTR*1) (DING et al., 2012). É interessante notar que o genótipo homozigoto para o alelo VNTR*2 foi associado a significativos menores níveis de IL-1B em sobrenadantes de culturas celulares (P=0,003) e portanto o possível papel deste polimorfismo no desenvolvimento de periodontite (DING et al., 2012).

Até o presente momento, esta revisão sistemática com abordagem Bayesiana é a primeira a avaliar a possível taxa de falsos achados em metanálises sobre polimorfismos em diversas IL's e o risco de CP. Nossos dados são acurados pelos robustos métodos estatísticos já usados em estudos anteriores com outras condições inflamatórias (JENGO et al., 2018). Contudo, importantes limitações devem ser notadas e discutidas, Primeiramente, as metanálises mostraram falhas que foram bem relatadas pelos próprios autores tais como número limitados de estudos inclusos e a ausência de uma completa avaliação étnica. Esses fatores também interferem nos nossos resultados. Como explicado anteriormente no texto, a Etnia afeta a frequência de genes de citocinas e portanto, podem introduzir viés nos resultados. Se a etnia não for bem descrita, os dados não poderão ser avaliados com base em grupos étnicos. Segundo, a periodontite é uma doença multifatorial em que não apenas o perfil genético é determinante para o risco da doença. As metanálises inclusas nos nossos resultados falharam em trazer outras comparações sobre idade, hábito de fumar e outras condições comportamentais dos participantes envolvidos nas avaliações. Terceiro, a periodontite foi modificada em sua classificação clínica em que um novo modelo para a doença foi proposto dissolvendo as classificações anteriores de CP e AgP (CATON et al., 2018), futuros estudos devem focar nessa nova classificação para possíveis futuras metanálises.

Em conclusão, identificamos que os polimorfismos rs1800587 no gene da IL-1A e rs1143634 no gene da IL-1B apresentaram valores dignos de nota para a susceptibilidade de CP. Esperamos que esses dados possam ser usados em estudos genéticos em periodontia e auxiliarem futuros programas de triagem.

Referências

- Armingohar Z, Jørgensen JJ, Kristoffersen AK, Schenck K, Dembic Z. 2014. Polymorphisms in the Interleukin-1 Gene Locus and Chronic Periodontitis in Patients with Atherosclerotic and Aortic Aneurysmal Vascular Diseases. *Scand J Immunol.* 79(5):338-345. doi:10.1111/sji.12166.
- Banu S, Jabir NR, Mohan R, Manjunath NC, Kamal MA, Kumar KR, Zaidi KR, Khan MS, Tabrez S. 2015. Correlation of Toll-like receptor 4, interleukin-18, transaminases, and uric acid in patients with chronic periodontitis and healthy adults. *J Periodontol.* 86(3):431-439. doi:10.1902/jop.2014.140414.
- Boukourt KN, Saidi-Ouahrani N, Boukerzaza B, Ouhaibi-Djellouli H, Hachmaoui K, Benaissa FZ, Taleb L, Drabla-Ouahrani H, Deba T, Ouledhamou SA, et al. 2015. Association analysis of the IL-1 gene cluster polymorphisms with aggressive and chronic periodontitis in the Algerian population. *Arch Oral Biol.* 60(10):1463-1470. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.06.018.
- Braosi AP, de Souza CM, Luczysyn SM, Dirschnabel AJ, Claudino M, Olandoski M, Probst CM, Garlet GP, Pecoits-Filho R, Trevilatto PC. 2012. Analysis of IL1 gene polymorphisms and transcript levels in periodontal and chronic kidney disease. *Cytokine.* 60(1):76-82. doi:10.1016/j.cyto.2012.06.006.
- Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papananou PN, Sanz M, Tonetti MS. 2018. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* 89 (Suppl 1):S1-S8. doi:10.1002/JPER.18-0157.
- Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. 2016. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol.* 17(8):906-913. doi:10.1038/ni.3503.
- Ding C, Zhao L, Sun Y, Li L, Xu Y. 2012. Interleukin-1 receptor antagonist polymorphism (rs2234663) and periodontitis susceptibility: a meta-analysis. *Arch Oral Biol.* 57(6):585-593. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.01.016.
- Eke PI, Thornton-Evans GO, Wei L, Borgnakke WS, Dye BA, Genco RJ. 2018. Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2014. *J Am Dent Assoc.* 149(7):576-588.e6. doi: 10.1016/j.adaj.2018.04.023.
- Evangelou E, Ioannidis JP. 2013. Meta-analysis methods for genome-wide association studies and beyond. *Nat Rev Genet.* 14(6):379-389. doi:10.1038/nrg3472.
- Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. 2013. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 39(6):1003-1018. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.010.

Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. 2002. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. *Am J Transplant.* 2(6):560-567.

Hulkkonen J, Laippala P, Hurne M. 2000. A rare allele combination of the interleukin-1 gene complex is associated with high interleukin-1b plasma levels in healthy individuals. *Eur Cytokine Netw.* 11(2):251-255.

Ioannidis JP, Boffetta P, Little J, O'Brien TR, Uitterlinden AG, Vineis P, Balding DJ, Chokkalingam A, Dolan SM, Flanders WD, Higgins JP, McCarthy MI, McDermott DH, Page GP, Rebbeck TR, Seminara D, Khoury MJ. 2008. Assessment of cumulative evidence on genetic associations: interim guidelines. *Int J Epidemiol.* 37(1):120-132.

Isaza-Guzmán DM, Hernández-Viana M, Bonilla-León DM, Hurtado-Cadavid MC, Tobón-Arroyave SI. 2016. Determination of NLRP3 (rs4612666) and IL-1B (rs1143634) genetic polymorphisms in periodontally diseased and healthy subjects. *Arch Oral Biol.* 65:55-51. doi:10.1016/j.archoralbio.2016.01.013.

Jeong DY, Lee SW, Park YH, Choi JH, Kwon YW, Moon G, Eisenhut M, Kronbichler A, Shin JI. 2018. Genetic variation and systemic lupus erythematosus: A field synopsis and systematic meta-analysis. *Autoimmun Rev.* 17(6):553-566. doi:10.1016/j.autrev.2017.12.011.

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. 2017. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 3:17038. doi:10.1038/nrdp.2017.38.

Kobayashi T, Ito S, Kuroda T, Yamamoto K, Sugita N, Narita I, Sumida T, Gejyo F, Yoshie H. 2007. The interleukin-1 and Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol.* 78(12):2311-2318.

Li ZG, Li JJ, Sun CA, Jin Y, Wu WW. 2014. Interleukin-18 promoter polymorphisms and plasma levels are associated with increased risk of periodontitis: a meta-analysis. *Inflamm Res.* 63(1):45-52. doi:10.1007/s00011-013-0669-1.

Liu DJ, Peloso GM, Zhan X, Holmen OL, Zawistowski M, Feng S, Nikpay M, Auer PL, Goel A, Zhang H, Peters U, Farrall M, Orho-Melander M, Kooperberg C, McPherson R, Watkins H, Willer CJ, Hveem K, Melander O, Kathiresan S, Abecasis GR. 2014. Meta-analysis of gene-level tests for rare variant association. *Nat Genet.* 46(2):200-204. doi:10.1038/ng.2852.

Majumdar A, Haldar T, Bhattacharya S, Witte JS. 2018. An efficient Bayesian meta-analysis approach for studying cross-phenotype genetic associations. *PloS Genet.* 14(2):e1007139. doi:10.1371/journal.pgen.1007139.

Mao M, Zeng XT, Ma T, He W, Zhang C, Zhou J. 2013. Interleukin-1α- 899 (+ 4845) C→ T polymorphism increases the risk of chronic periodontitis: Evidence from a meta-

analysis of 23 case-control studies. *Gene*. 532(1):114-119. doi:10.1016/j.gene.2013.09.043.

Moura MF, Navarro TP, Silva TA, Cota LOM, Oliveira AMSD, Costa FO. 2017. Periodontitis and Endothelial Dysfunction: Periodontal Clinical Parameters and Levels of Salivary Markers Interleukin-1 β , Tumor Necrosis Factor- α , Matrix Metalloproteinase-2, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 Complex, and Nitric Oxide. *J Periodontol*. 88(8):778-787. doi:10.1902/jop.2017.170023.

Munafò MR, Flint J. 2004. Meta-analysis of genetic association studies. *Trends Genet*. 20(9):439-444.

Ni XB, Jia C, Yu HD, Li YQ, Zeng XT, Leng WD. 2017. Comprehensive analysis of interleukin-8 gene polymorphisms and periodontitis susceptibility. *Oncotarget*. 8(30):48996-49004. doi:10.18632/oncotarget.16922.

Nuzzo R. 2014. Statistical errors: P values, the gold standard of statistical validity, are not as reliable as many scientists assume. *Nature*. 506(7487):150-153.

Oppermann RV, Haas AN, Rosing CK, Susin C. 2015. Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. *Periodontol 2000*. 67(1):13-33. doi:10.1111/prd.12061.

Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. 2000. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1 α protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res*. 79(11):1864-1869.

Silva FRP, Pessoa LS, Vasconcelos ACCG, Lima WA, Alves EHP, Vasconcelos DFP. 2017. Polymorphisms in interleukins 17A and 17F genes and periodontitis: results from a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 44(6):443-453. doi:10.1007/s11033-017-4128-x.

Silva FRP, Vasconcelos ACCG, França LFC, Lenardo D, Rodrigues LS, Nascimento MLLB, Vasconcelos DFP. 2017. Relationship between-889 C/T polymorphism in interleukin-1A gene and risk of chronic periodontitis: evidence from a meta-analysis with new published findings. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 22(1):e7-e14.

Silva FRP. Vasconcelos ACCG, França LFC, Lenardo D, Nascimento HMS, Vasconcelos DFP. 2018. Association between the rs1143634 polymorphism in interleukin-1B and chronic periodontitis: Results from a meta-analysis composed by 54 case/control studies. *Gene*. 668:97-106. doi:10.1016/j.gene.2018.05.067.

Song GG, Choi SJ, Ji D, Lee YH. 2013. Association between tumor necrosis factor- α promoter- 308 A/G,- 238 A/G, interleukin-6- 174 G/C and- 572 G/C polymorphisms and periodontal disease: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 40(8):5191-5203. doi:10.1007/s11033-013-2621-4.

Suwama K, Yoshihara A, Watanabe R, Stegaroiu R, Shibata S, Miyazaki H. 2018. Relationship between alcohol consumption and periodontal tissue condition in

community-dwelling elderly Japanese. *Gerodontology*. 35(3):170-176. doi:10.1111/ger.12335.

Wacholder S, Chanock S, Garcia-Closas M, El Ghormli L, Rothman N. 2004. Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. *J Natl Cancer Inst*. 96(6):434-442.

Wakefield J. 2007. A Bayesian measure of the probability of false discovery in genetic epidemiology studies. *Am J Hum Genet*. 81(2):208-227.

Wang HF, He FQ, Xu CJ, Li DM, Sun XJ, Chi YT, Guo W. 2017. Association between the interleukin-1 β C-511T polymorphism and periodontitis: a meta-analysis in the Chinese population. *Genet Mol Res*. 16(1). doi:10.4238/gmr16019315.

Wiedemann GM, Knott MM, Vetter VK, Rapp M, Haubner S, Fessler J, Kühnemuth B, Layritz P, Thaler R, Kruger S, Ormanns S, Mayr D, Endres S, Anz D. 2016. Cancer cell-derived IL-1 α induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells. *Oncoimmunology*; 5(9):e1175794.

Yan Y, Weng H, Shen ZH, Wu L, Zeng XT. 2014. Association Between Interleukin-4 Gene- 590 C/T,- 33 C/T, and 70-Base-Pair Polymorphisms and Periodontitis Susceptibility: A Meta-Analysis. *J Periodontol*. 85(11):e354-e362. doi:10.1902/jop.2014.140317.

Yang ZH, Dai Q, Zhong L, Zhang X, Guo QX, Li SN. 2011. Association of IL-1 polymorphisms and IL-1 serum levels with susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog*. 50(3):208-214. doi:10.1002/mc.20706.

Yoshimura K, Hanaoka T, Ohnami S, Ohnami S, Kohno T, Liu Y, Yoshida T, Sakamoto H, Tsugane S. 2003. Allele frequencies of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 40 candidate genes for gene-environment studies on cancer: data from population-based Japanese random samples. *J Hum Genet*. 48(12):654-658.

Zhu J, Guo B, Fu M, Guo W, Yuan Y, Yuan H, Zhang S, Yu H. 2016. Interleukin-6-174G/C polymorphism contributes to periodontitis susceptibility: an updated meta-analysis of 21 case-control studies. *Dis Markers*. 2016:9612421. doi:10.1155/2016/9612421.

6 CAPÍTULO V

6.1 Considerações finais

Dentro das limitações observadas, os estudos de metanálises detectaram a associação não significativa entre o polimorfismo -330 T/G no gene IL2 e o risco de periodontite crônica, bem como na análise estratificada. Em contrapartida, o polimorfismo rs1333048 no gene ANRIL foi significativamente associado ao risco de desenvolvimento de periodontite na análise geral sem interferência de heterogeneidade estatística. Nenhum viés de publicação foi detectado nas metanálises comprovando a acurácia dos resultados. Em complemento, a abordagem Bayesiana detectou a não notoriedade dos polimorfismos IL-1RN/rs2234663, IL-4/rs2243250, IL-6/rs1800796/rs1800795, IL-17A/rs2275913 e IL-18/rs1946518/rs187238 na periodontite em que apenas os polimorfismos IL 1A/rs1800587, 1B/rs1143634 foram “dignos de nota”.

6.2 Perspectivas futuras

Este trabalho pode ser considerado uma pesquisa de base para o desenvolvimento de marcadores moleculares com foco no risco de desenvolvimento de periodontite. Futuramente, quando os testes genéticos tornarem-se mais acessíveis à população e mais voltados à clínica médica e odontológica, pacientes oriundos de população caucasiana, asiática e miscigenada (Brasileiros e outras etnias) poderão realizar testes genéticos para os polimorfismos que tiveram associação significativa nas presentes metanálises com a determinação do possível risco da doença e assim uma apropriada abordagem preventiva ou terapêutica. Com os resultados destas metanálises também é possível determinar o foco de futuros estudos genéticos tomando como base as limitações observadas e denotadas pelos autores nas metanálises calculadas e coletadas na literatura.

ANEXO I

6.1 Artigo IV

Não associação entre polimorfismos no gene *Mannose Binding Lectin-2* e periodontite: uma metanálise

Felipe Rodolfo Pereira da Silva^{1,2}; Alessandro Luiz Araújo Bentes Leal³, Luigi Nibali, Jae Il Shin⁴, Marcelo Diniz Carvalho, Reyce Santos Koga², Mariana Brasil de Andrade Figueira¹, Juliana Gomes Galeno⁵, Diana Mota Toro¹, Zinalton Gomes de Andrade²; Nayana Yared Batista¹; José Fernando Marques Barcellos^{1,2}

¹ Aluno de Doutorado pelo Programa de Pós graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil;

² Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil;

³ Departamento de Farmácia, Universidade do Norte (UNINORTE), Manaus, Amazonas, Brasil;

⁴ Departamento de Pediatria, Escola de Medicina de Yonsei, Seul, República da Coreia;

⁵ Laboratório de Análise e Processamento Histológico da Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil;

Resumo

Objetivo: Este estudo objetivou realizar uma metanálise para verificar se os polimorfismos rs1800450 e 1800451 no gene *Mannose Binding Lectin-2* foram associados ao risco de periodontite.

Materiais e métodos: Uma busca na literatura foi realizada para estudos publicados anteriormente a 10 de Dezembro de 2019 em diversas bases de dados. Os cálculos de Odds Ratio (OR) com 95% de intervalo de confiança (IC) e heterogeneidade (I^2) foram medidos e o viés de publicação feito pelos testes de *Begg* e *Egger*, O valor de $P < 0,05$ foi considerado como significativo para todos os cálculos.

Resultados: Oito artigos sobre os polimorfismos já citados, periodontite crônica e discretas variações no diagnóstico compuseram os resultados em que associações não significativas foram encontrada em todas as comparações. Nem o alelo mutado

no polimorfismo rs1800450 nem o alelo mutado no polimorfismo rs1800451 foi associado à periodontite (OR=1,11, IC:0,90-1,38, P=0,33; OR=1,01, IC: 0,75-1,35, P=0,96, respectivamente) sem interferência de I² (0%, P=0,75 e 0%, P=0,65, respectivamente). A análise estratificada foi composta por Etnia em Caucasianos e população Miscigenada e métodos de genotipagem.

Conclusões: Esta metanálise mostrou a não associação significativa entre os polimorfismos no gene *Mannose Binding Lectin-2* e periodontite.

Palavras-chave: Variação genética, proteína de ligação à manana; doença periodontal, sistema imune.

Introdução

A periodontite é doença imune-inflamatória de elevada prevalência afetando os tecidos de suporte ao redor dos dentes que começa com a formação de bolsas periodontais no periodonto (BOSSHARDT, 2018; KÖNÖNEN; GURSOY; GURSOY, 2019). A doença afetou 1,7% de populações jovens (atingindo 0,66% na Argentina a 5,9% em Israel) (CATUNDA et al., 2019), teve índice de 42,3% de prevalência em uma população do Sul da Índia (BALAJI et al., 2018) com prevalência similar (42%) em adultos dos Estados Unidos (EKE et al., 2018). Contudo, a real epidemiologia da periodontite permanece ainda não esclarecida, especialmente devido aumentado viés dos métodos usados no diagnóstico clínico da doença (NAZIR et al., 2017; ROMANO et al., 2019).

A periodontite ocorre pela resposta imune contra um grupo específico de microrganismos classificados como periodontopatógenos tendo a *Prophyromonas gingivalis*, o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e a *Tannerella forsythia* como as principais espécies envolvidas na patogênese da periodontite (DEGASPERI et al., 2018; GHOLIZADEH et al., 2017; LAURITANO et al., 2016). A resposta imune é caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios tais como o fator de necrose tumoral (TNF- α) ou interleucinas (IL)-2, 4 e 6, tanto no fluido gengival (KOSHY et al., 2019) quanto no sangue periférico (GAUDILLIERE et al., 2019).

Essa inflamação não causa alteração apenas nos sítios periodontais (WINNING; LINDEN, 2017), mas também danos em órgãos sistêmicos seja por mecanismos diretos como a entrada de bactérias no sangue periférico seja por mecanismos indireta

como a liberação de mediadores inflamatórios do hospedeiro na corrente sanguínea (WINNING; LINDEN, 2015). Diversos estudos na literatura apresentam a associação entre diabetes (CHOU et al., 2015), obesidade (VIRTO et al., 2018), arterosclerose (CHISTIAKOV; OREKHOV; BOBRY SHEV, 2016) e alteração no fígado (VASCONCELOS et al., 2017) e periodontite.

Dentro da resposta imune inata que participa da inflamação inicial tem-se o participante intitulado *Mannose Binding Lectin* (MBL), um receptor solúvel integrante da família das lectinas tipo-C (THAISS et al., 2016). MBL é produzido pelo fígado, liberado em condições de estresse e expresso pelo gene MBL-2 como um polipeptídeo de 24 kD com uma sequência de 248 aminoácidos com uma região N terminal rica em cisteína, um domínio de colágeno, curto um domínio α helicoidal e uma região de reconhecimento de carboidrato (AURITI et al., 2017). O MBL é responsável pela opsonização de microrganismos e ativação do sistema complemento pelo complexo formado com serino-proteases associadas ao MBL que ativa a proteína C4 com subsequente ligação das frações C4b e C2a e formação de C4b2a que culmina com a via clássica do complemento (DOBÒ et al., 2016).

Alterações nos níveis de MBL estão associados com diversas condições inflamatórias e infecções (CIESLINKSI et al., 2017; SCORZA et al., 2015; XUE et al., 2016) em que variações genéticas no MBL-2 interferem diretamente no MBL com potencial predisposição a doenças inflamatórias (ALBUQUERQUE et al., 2018; RUSEVA et al., 2009). Diversas variantes genéticas ocorrem no gene MBL-2, contudo, dois polimorfismos são mais relatados com periodontite e outras doenças, os polimorfismos rs1800450 e rs1800451 (MOGHADAM et al., 2018; NEDOVIC et al., 2014). Variações genéticas no MBL-2 influenciam a estrutura proteica do MBL e consequentemente seu papel (KALIA et al., 2016).

Na literatura, os resultados de associação entre os polimorfismos citados e periodontite permanecem controversos. Devido não haver nenhum estudo que agregue essas informações, este estudo objetiva realizar uma metanálise sobre os resultados acerca dos polimorfismos rs1800450 e 1800451 e a susceptibilidade à periodontite.

Materiais e Métodos

O protocolo PRISMA (MOHER et al., 2009) foi usado durante o delineamento deste estudo. Esta metanálise está registrada no PROSPERO database sob o seguinte número de identificação: CRD42018116487.

Critérios de inclusão

Para serem inclusos nesta metanálise os estudos devem ter respeitado os seguintes critérios: (1) serem estudos do tipo caso/control ou de replicação genética; (2) os pacientes caso terem recebido diagnóstico de periodontite por rigorosa avaliação clínica respeitando critérios estabelecidos (EKE et al., 2012), (3) o grupo controle ter apresentado periodonto saudável, (4) as frequências genotípicas terem sido completamente documentadas, (5) os estudos terem sido realizados em humanos, (6) os participantes inclusos (casos e controles) não terem apresentado doenças cardiovasculares, doenças autoimunes ou gravidez. Entretanto, alguns estudos apresentaram pacientes com diabetes e devido à importância em se obter um maior número de artigos inclusos, estes estudos foram considerados. Os autores entendem a possibilidade do potencial viés com a inclusão de estudos com pacientes portadores de doenças sistêmicas. Portanto, este tipo de estudo foi submetido a uma rigorosa análise sensitiva para detecção de potencial viés. Como uma metanálise, este estudo não requer aprovação por Comitê de Ética.

Estratégia de busca

A busca na literatura foi realizada por dois investigadores nas bases de dados *Google Scholar*, *Medline*, *Pubmed*, *WAFANG* e *Web of Science*. A busca na literatura foi realizada para estudos publicados anteriormente a 10 de dezembro de 2019. A seguinte combinação de descritores foi usada: “*periodontitis* ou *periodontal disease* ou *chronic periodontitis* ou *aggressive periodontitis*” e “*polymorphism* ou *genetic variation*” e “*MBL2* ou *Mannose-Binding Lectin gene*” e “*rs1800450 polymorphism* ou *rs1800451 polymorphism*”. Nenhuma restrição de linguagem foi aplicada na busca o qual as referências dos estudos inclusos foram avaliadas para coleta de algum estudo adicional.

Processo de coleta dos dados

Três investigadores (FRPS, ALABL e JGG) coletaram os dados seguindo um formulário padronizado que compôs a tabela de características dos estudos apresentada nos resultados.

Determinação da qualidade dos estudos individuais

Para verificar a qualidade metodológica dos estudos, a escala proposta por Nibali (2013) que eleva a qualidade de metanálises no campo dos estudos genéticos em periodontia foi usada em que estudos que receberam menos de 10 pontos nesta escala binária foram excluídos.

Análise estatística

O *software* estatístico *Review Manager* versão 5.3 (RevMan, *Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, 2012*) para revisões sistemáticas e metanálises foi usado nos cálculos. O viés de publicação foi avaliado pelo *software* estatístico *Comprehensive Meta-analysis* versão 3.3.070 (2014), disponível para treino.

A presença ou ausência de heterogeneidade (I^2), foi calculada pelo teste do qui-quadrado baseado no teste estatístico Q e analisada pelo gráfico de *Funnel-plot* para heterogeneidade. Quando o valor observado de I^2 não foi estatisticamente significativo ($I^2 < 50\%$, $P > 0,05$), os autores usaram o modelo de efeitos fixos para cálculo do *Odds Ratio* (OR) agrupado. Quando I^2 apresentou significância estatística ($I^2 > 50\%$, $P < 0,05$), o modelo de efeitos aleatórios foi usado para o cálculo de OR. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Para determinar a exata influência da variação genética nos cálculos da metanálise, seis modelos genéticos foram calculados tomando como base “M” como alelo mutado e “m” como alelo selvagem. Assim, obtiveram-se comparações alélicas: (I) M versus m, (II) m versus M; comparações genotípicas: (III) MM versus mm, (IV) mm versus MM; E a combinação entre as variações genotípicas: (V) MM versus mm + Mm e (VI) Mm versus mm + MM. O teste de *Begg* e o teste de regressão linear de *Egger* (com valor de $P < 0,05$) foram as análises estatísticas usadas para determinar potencial viés de publicação na metanálise, a assimetria no gráfico de *Funnel-plot* para viés de publicação também foi considerado. Em complemento, os autores realizaram uma análise sensitiva para avaliar a robustez dos resultados agrupados. Houve a omissão de cada estudo

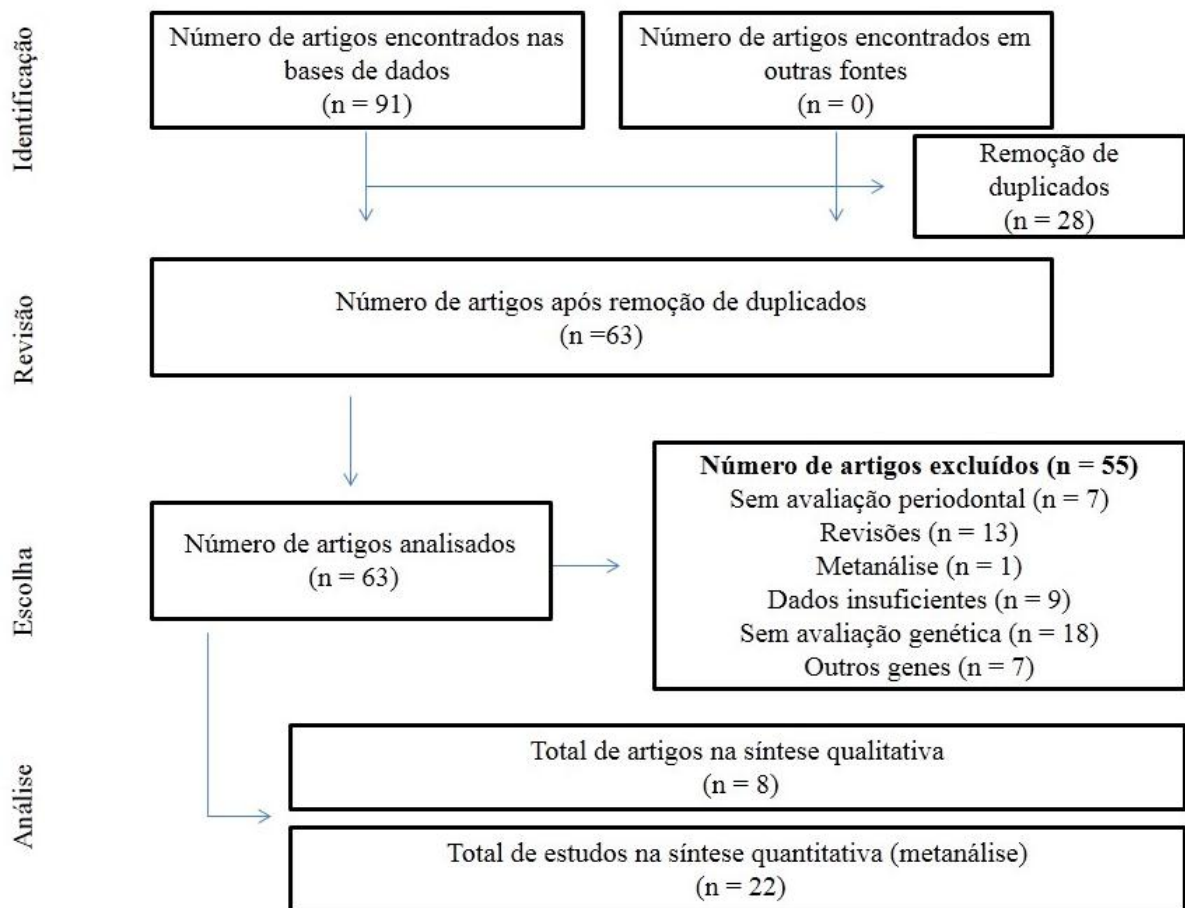
inclusos por vez para detectar efeitos individuais nas análises gerais. Todos os dados inclusos foram dados dicotômicos expressos por meio de OR com 95% de intervalo de confiança (CI) para determinar a possível associação entre as variantes genéticas anteriormente mencionadas e a periodontite.

Resultados

Características dos estudos inclusos

A busca inicial trouxe o total de 92 artigos nas bases de dados usadas. Após as etapas de revisão e avaliação dos potenciais estudos, 57 artigos foram excluídos e oito permaneceram na síntese qualitativa como mostrado na figura 1. As análises envolveram 1.489 participantes para os polimorfismos no gene MBL-2, mais detalhes estão disponíveis na tabela 1.

Figura 1. Fluxograma de seleção dos estudos inclusos nesta metanálise



Fonte: Próprio autor

Os artigos foram publicados no período de 2008 a 2018 em diversos grupos étnicos totalizando sete artigos com 12 estudos sobre o polimorfismo rs1800450 no gene MBL-2 (ARAÚJO et al., 2009; 2011; IMAMURA et al., 2011; LIUKKONEN et al., 2017; ÖZÇAKA et al., 2010; TSUTSUMI et al., 2009) e seis artigos com 10 estudos sobre o polimorfismo rs1800451 também no gene MBL-2 (ARAÚJO et al., 2009; 2011; IMAMURA et al., 2011; LOUROPOULOU et al., 2008; MOGHADAM et al., 2018). Os estudos foram realizados em Caucasianos de diferentes países (LIUKKONEN et al., 2017; LOUROPOULOU et al., 2008; MOGHADAM et al., 2018; ÖZÇAKA et al., 2010), Asiáticos do Japão (IMAMURA et al., 2011; TSUTSUMI et al., 2009) e população Miscigenada do Brasil (ARAÚJO et al., 2009; 2011).

A periodontite foi diagnosticada nos estudos como CP (MOGHADAM et al., 2018; ÖZÇAKA et al., 2010), CP leve/moderada (TSUTSUMI et al., 2009), CP severa (TSUTSUMI et al., 2009), periodontite moderada (IMAMURA et al., 2011), periodontite severa (IMAMURA et al., 2011), periodontite generalizada (LIUKKONEN et al., 2017) e periodontite localizada (LIUKKONEN et al., 2017).

Tabela 1 – Características dos estudos inclusos nesta recente metanálise

Autor e Ano	Etnia/País	Modelo de estudo	Diagnóstico (Subtipos clínicos)	Subgrupo de estudo	N amostral (Cc/Co)	Idade (anos) (Cc/Co)
Araujo (2009)	Miscigenada/Brasil	Caso/Controle	P	-	30/20	52,78 (35-75)
Araujo (2011)	Miscigenada/Brasil	Caso/Controle	P	-	61/39	54,1±9,54
Imamura (2011)	Asiáticos/Japão	Caso/Controle	P moderada	Síndrome de Down	16/12	42,9±13,5/19,3±11,0
				Sem síndrome de Down	16/10	43,0±7,1/19,2±1,0
			P severa	Síndrome de Down	4/12	42,8±16,7/19,3±11,0
				Sem síndrome de Down	2/10	52,0±7,1/19,2±1,0
Liukkonen (2016)	Caucasianos/Finlândia	Caso/Controle	P generalizada	-	80/77	40-60
Louropoulou (2008)	Caucasianos/Holanda	Caso/Controle	P localizada	-	65/77	40-60
Moghadam (2018)	Caucasianos/Irã	Caso/Controle	CP	-	40/50	35±10,7/31±4,5
Özçaka (2010)	Caucasianos/Turquia	Caso/Controle	CP	-	83/89	48±8,5/46,6±8,35
Tsutsumi (2009)	Asiáticos/Japão	Caso/Controle	CP leve/moderada	-	47/63	49,8±1,6/27,0±0,5
			CP severa	-	51/63	46,9±1,5/27,0±0,5

Autor e Ano	Parâmetros clínicos (Cc/Co)			Polimorfismo(s) avaliado(s)	EHW (P- Grupo avaliado)	Método de genotipagem	Escore adicional
	Profundidade de sondagem (mm)	Perda de inserção clínica (mm)	Índice de placa (%)				
Araujo (2009)	ND	ND	54,04±31,64/ND	rs1800450/rs1800451	SIM*	RT-PCR	12
Araujo (2011)	ND	ND	63,83±29,33/ND	rs1800450/rs1800451	SIM*	RT-PCR	12
Imamura (2011)	ND	ND	ND	rs1800450/rs1800451	ND	PCR-RFLP	13
Liukkonen (2016)	ND	ND	ND	rs1800450/rs1800451	ND	PCR	14
Louropoulou (2008)	ND	ND	ND	rs1800450/rs1800451	SIM	TaqMan	16
Moghadam (2018)	2,9±0,8/NA	3,2±0,5/ND	68,8±22,7/<15	rs1800451	(P>0,05 – Co)	Tetra-ARMS	14
Özçaka (2010)	3,89±0,81/1,43±0,3	5,12±1,33/0,26±0,34	82,03±22,02/12,85±9,33	rs1800450	SIM	PCR	18
Tsutsumi (2009)	1,8±0,1/<3,0	3,2±0,1/<3	ND	rs1800450	(P=0,94 – Co)	PCR-RFLP	14
	4,2±0,1/<3	5,0±1,4/<3	ND		ND	PCR-RFLP	

Legenda: Cc-Grupo caso, Co-Grupo controle, mm-milímetros, EWH-Equilíbrio de Hardy-Weinberg, Miscigenada–Americanos e outras etnias, ND–Não disponível, *-Não informado, P-Periodontite; CP–Periodontite crônica.

Em complemento, dois artigos incluíram participantes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (ARAÚJO et al., 2009; 2011) e um artigo estratificou seus pacientes em saudáveis e pacientes com Síndrome de *Down* (IMAMURA et al., 2011). Detalhes complementares sobre os estudos inclusos também são mostrados na tabela 1.

Resultados da metanálise

Associações não significativas foram encontradas nas análises sobre os polimorfismos no gene MBL-2 e o risco de periodontite para qualquer avaliação alélica ou genotípica (Figura 2). Como mostrado nas tabelas 2 e 3, por meio dos valores de OR, nem o polimorfismo rs1800450 nem o polimorfismo rs1800451 foi significativamente associado com o risco de periodontite na análise geral bem como nas análises de subgrupos ($P > 0,05$). Por exemplo, não houve associação significativa entre o alelo mutado no polimorfismo rs1800450 com a periodontite (OR=1,11, IC: 0,90-1,38, $P=0,33$) nem entre o alelo mutado no polimorfismo rs1800451 (OR=1,01, IC: 0,75-1,35, $P=0,96$).

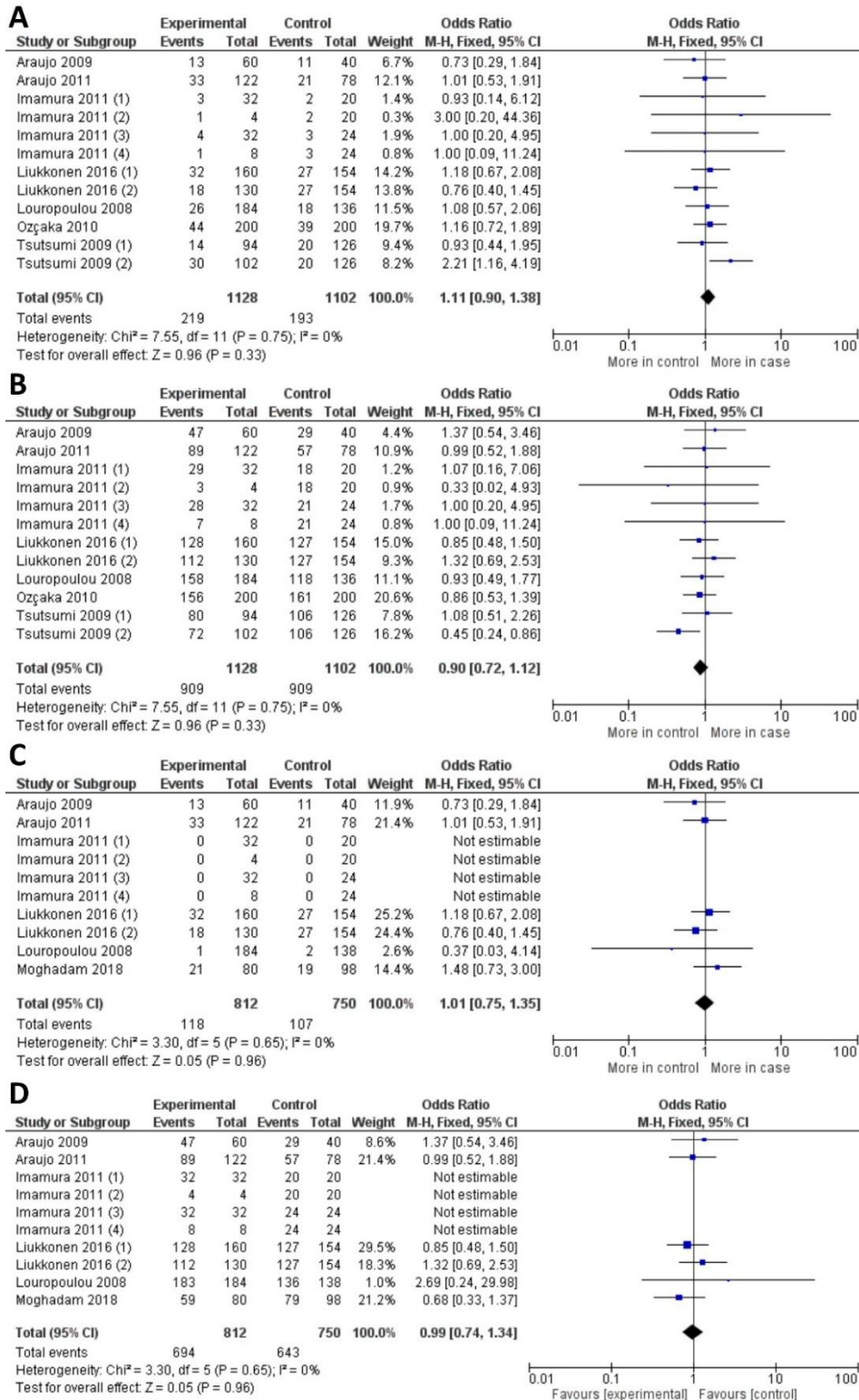
Os dados sobre I^2 mostraram um valor não significativo nesses cálculos ($I^2=0\%$, $P=0,75$ e $I^2=0\%$, $P=0,65$, respectivamente). Um estudo (TSUTSUMI et al., 2009) ficou fora do gráfico de *Funnel-plot* para o polimorfismo rs1800450 mas nenhum para o polimorfismo rs1800451 (Figura 3). Devido a não interferência de I^2 , o modelo de efeito fixo foi usado em todos os cálculos. As análises de subgrupo foram realizadas com base no diagnóstico da periodontite, etnia e método de genotipagem para o polimorfismo rs1800450 e na etnia para o polimorfismo rs1800451.

Para este último polimorfismo, as análises de subgrupos para diferentes formas de periodontite não puderam ser realizadas devido o limitado número de estudos inclusos.

Análise sensitiva e viés de publicação

A análise sensitiva e a análise acumulativa foram realizadas e demonstraram que nenhum estudo individual pôde interferir no valor de OR provando a acurácia destes resultados (Figura 4 e Figura 5). A análise do gráfico de *Funnel-plot* para viés de publicação não revelou qualquer assimetria para ambos os polimorfismos (Figura 6).

Figura 2. Metanálise de comparação entre os polimorfismos rs1800450 e 1800451 e o risco de periodontite entre (A) o alelo mutado versus o alelo selvagem no polimorfismo rs1800450 e (B) o alelo selvagem versus o mutado neste polimorfismo; e entre (C) o alelo mutado versus o alelo selvagem no polimorfismo rs1800451 e (D) o alelo selvagem versus o mutado neste polimorfismo



Fonte: Próprio autor

Tabela 2. Cálculos da metanálise sobre o polimorfismo rs1800450 e o risco de periodontite (comparações alélicas e genotípicas; análises de subgrupo).

Comparação (n)	OR (95% IC)	P (Teste Z)	I ²	Pheterogeneidade	Modelo estatístico usado
Geral (n = 12)					
M versus m	1,11 (0,90-1,38)	0,33	0	0,75	F
m versus M	0,90 (0,72-1,12)	0,33	0	0,75	F
MM versus mm	1,87 (0,83-4,21)	0,13	0	0,78	F
mm versus MM	0,53 (0,24-1,20)	0,13	0	0,78	F
MM versus Mm/mm	1,82 (0,81-4,09)	0,15	0	0,86	F
Mm versus MM/mm	1,03 (0,79-1,33)	0,84	0	0,83	F
P moderada (n = 2)					
M versus m	1,31 (0,27-6,30)	0,74	0	0,48	F
m versus M	0,76 (0,16-3,67)	0,74	0	0,48	F
MM versus mm	NE	-	-	-	-
mm versus MM	NE	-	-	-	-
MM versus Mm/mm	NE	-	-	-	-
Mm versus MM/mm	1,36 (0,25-7,35)	0,72	0	0,44	F
P severa (n = 2)					
M versus m	1,00 (0,26-3,80)	1,00	0	1,00	F
m versus M	1,00 (0,26-3,80)	1,00	0	1,00	F
MM versus mm	NE	-	-	-	-
mm versus MM	NE	-	-	-	-
MM versus Mm/mm	NE	-	-	-	-
Mm versus MM/mm	1,00 (0,24-4,23)	1,00	0	1,00	F
Caucasianos (n = 4)					
M versus m	1,06 (0,79-1,40)	0,71	0	0,72	F
m versus M	0,95 (0,71-1,26)	0,71	0	0,72	F
MM versus mm	1,62 (0,63-4,20)	0,32	0	0,97	F
mm versus MM	0,62 (0,24-1,59)	0,32	0	0,97	F
MM versus Mm/mm	1,66 (0,65-4,28)	0,23	0	0,97	F
Mm versus MM/mm	0,94 (0,67-1,32)	0,73	0	0,43	F
Miscigenada (n = 2)					
M versus m	0,91 (0,54-1,54)	0,72	0	0,58	F
m versus M	1,10 (0,65-1,86)	0,72	0	0,58	F
MM versus mm	NE	-	-	-	-
mm versus MM	NE	-	-	-	-
MM versus Mm/mm	NE	-	-	-	-
Mm versus MM/mm	0,86 (0,45-1,65)	0,65	0	0,50	F
PCR-RFLP (n = 7)					
M versus m	1,31 (0,95-1,81)	0,10	0	0,64	F
m versus M	0,76 (0,55-1,05)	0,10	0	0,64	F
MM versus mm	2,55 (0,69-9,45)	0,16	0	0,38	F
mm versus MM	0,39 (0,11-1,45)	0,16	0	0,38	F
MM versus Mm/mm	2,24 (0,60-8,35)	0,23	0	0,46	F
Mm versus MM/mm	1,26 (0,87-1,84)	0,22	0	0,91	F

Este achado corrobora com os valores não significativos dos testes de *Begg* e *Egger* para o polimorfismo rs1800450 ($P = 0,837$ e $P = 0,836$, respectivamente) e rs1800451 ($P = 0,452$ e $P = 0,263$, respectivamente).

Tabela 3. Cálculos da metanálise sobre o polimorfismo rs1800451 e o risco de periodontite (comparações alélicas e genotípicas; análises de subgrupo).

Comparação (n)	OR (95% IC)	P (Teste Z)	I ²	<i>Pheterogeneidade</i>	Modelo estatístico usado
Geral (n = 10)					
M versus m	1,01 (0,75-1,35)	0,96	0	0,65	F
m versus M	0,99 (0,74-1,34)	0,96	0	0,65	F
MM versus mm	1,98 (0,65-6,06)	0,23	0	0,92	F
mm versus MM	0,51 (0,16-1,55)	0,23	0	0,92	F
MM versus Mm/mm	2,02 (0,66-6,14)	0,22	0	0,98	F
Mm versus MM/mm	0,87 (0,60-1,24)	0,43	0	0,59	F
Caucasianos (n = 4)					
M versus m	1,06 (0,74-1,51)	0,76	0	0,43	F
m versus M	0,95 (0,66-1,35)	0,76	0	0,43	F
MM versus mm	1,98 (0,65-6,06)	0,23	0	0,92	F
mm versus MM	0,51 (0,16-1,55)	0,23	0	0,92	F
MM versus Mm/mm	2,02 (0,66-6,14)	0,22	0	0,98	F
Mm versus MM/mm	0,87 (0,56-1,33)	0,52	9	0,35	F
Miscigenada (n = 2)					
M versus m	0,91 (0,54-1,54)	0,72	0	0,58	F
m versus M	1,10 (0,65-1,86)	0,72	0	0,58	F
MM versus mm	NE	-	-	-	-
mm versus MM	NE	-	-	-	-
MM versus Mm/mm	NE	-	-	-	-
Mm versus MM/mm	0,86 (0,45-1,65)	0,65	0	0,50	F

Discussão

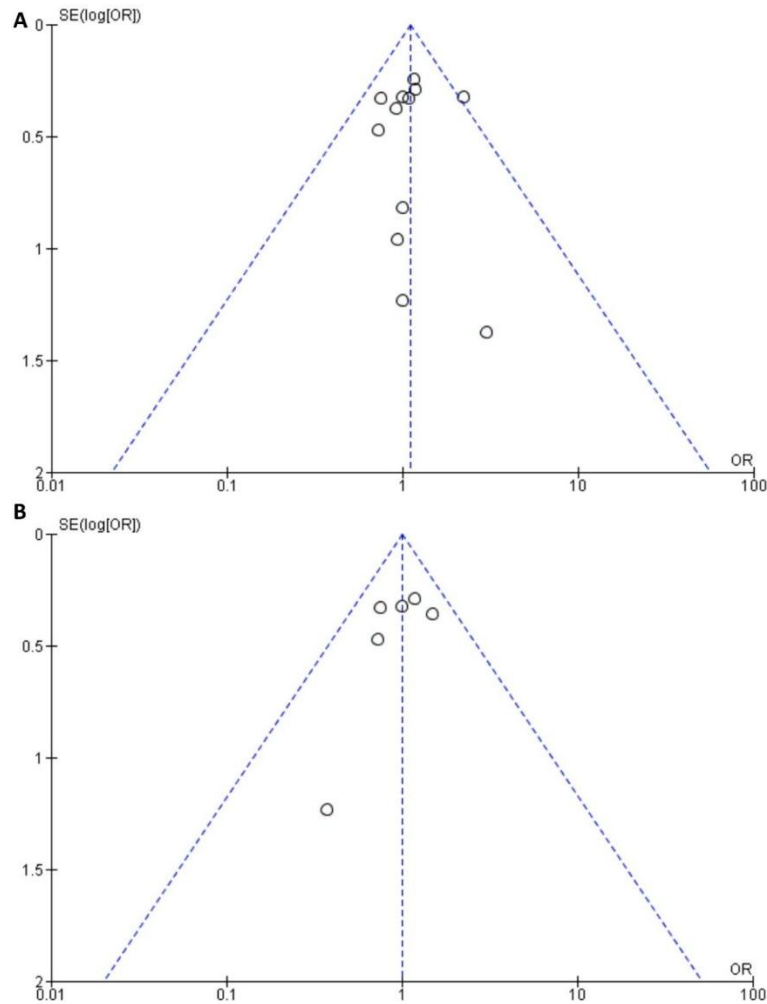
Ao melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de metanálise realizado para avaliar os polimorfismos rs1800450 e 1800451 no gene MBL-2 e o risco de periodontite.

Uma metanálise anterior avaliou apenas o polimorfismo rs1800450 e foi composta por três estudos que trouxeram dados limitados sobre a possível associação com o risco de CP (HAN et al., 2015) em que os autores não encontraram associação significativa entre essa variação genética e o risco da doença. O número limitado de estudos encontrados na literatura focando nos polimorfismos no gene MBL-2 e periodontite traz dados incertos que promovem viés durante a interpretação destes resultados.

A metanálise é uma ferramenta estatística para pesquisas em genética pela combinação de resultados divergentes disponíveis na literatura, permitindo a identificação de associações verdadeiras pelo aumento do poder de associação e

assim resolvendo a possível ocorrência de falsos positivos ou falsos negativos nesses tipos de estudos (LEE, 2015; TRIKALINOS et al., 2008).

Figura 3. Funnel-plot para heterogeneidade na comparação do alelo mutado versus o alelo selvagem nos polimorfismos (A) rs1800450 e (B) rs1800451 e o risco de periodontite.



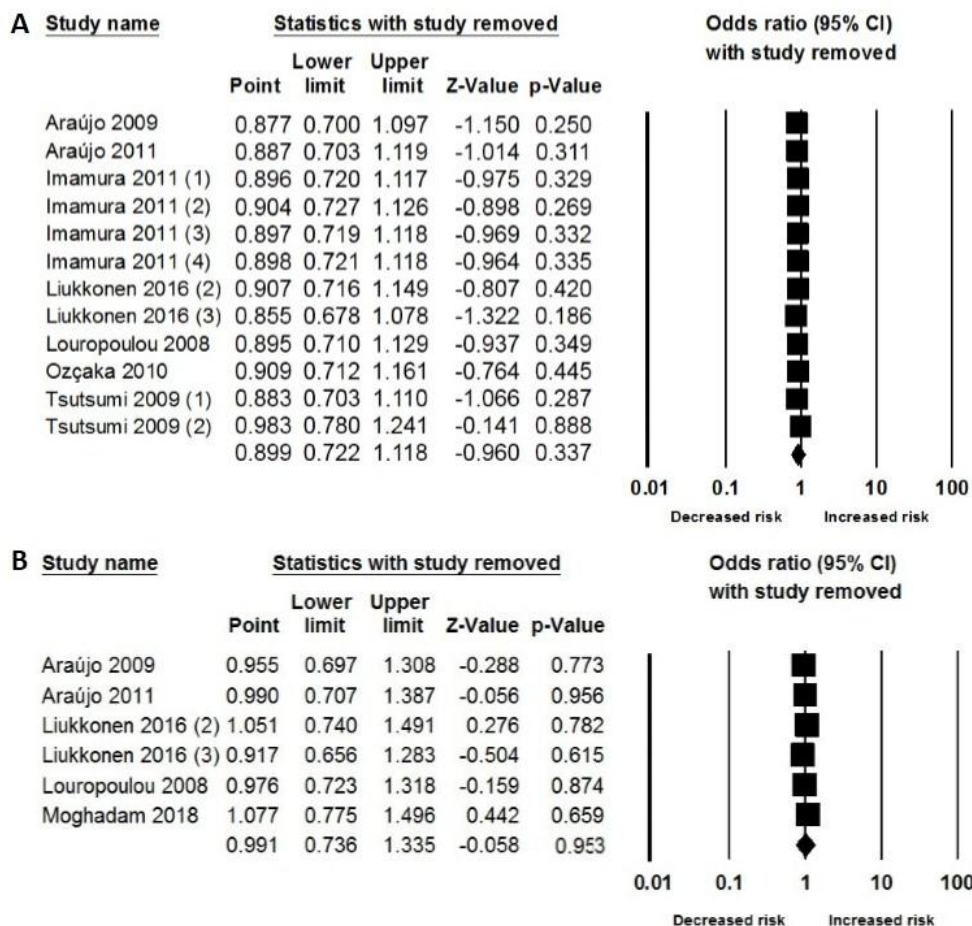
Fonte: Próprio autor

Nossos dados corroboram com a metanálise de Han et al. (2015). Contudo, trouxemos um aumento no total de estudos inclusos para ambos os polimorfismos rs1800450 e 1800451 (n=12 e n=10, respectivamente). A associação não significativa observada nessa metanálise anterior foi reavaliada e confirmada por nosso estudo.

Além disso, importantes achados foram observados em nossos resultados como a expansão dos resultados sobre outros diagnósticos de CP, o não significativo valor de I^2 , o modelo de efeito fixo usado em todas as comparações calculadas, a ausência

de viés de publicação e a acurácia estatística e metodológica evidenciada pela análise sensitiva.

Figura 4. Análise sensitiva para a metanálise de comparação alélica nos polimorfismos (A) rs1800450 e (B) rs1800451 e o risco de periodontite.



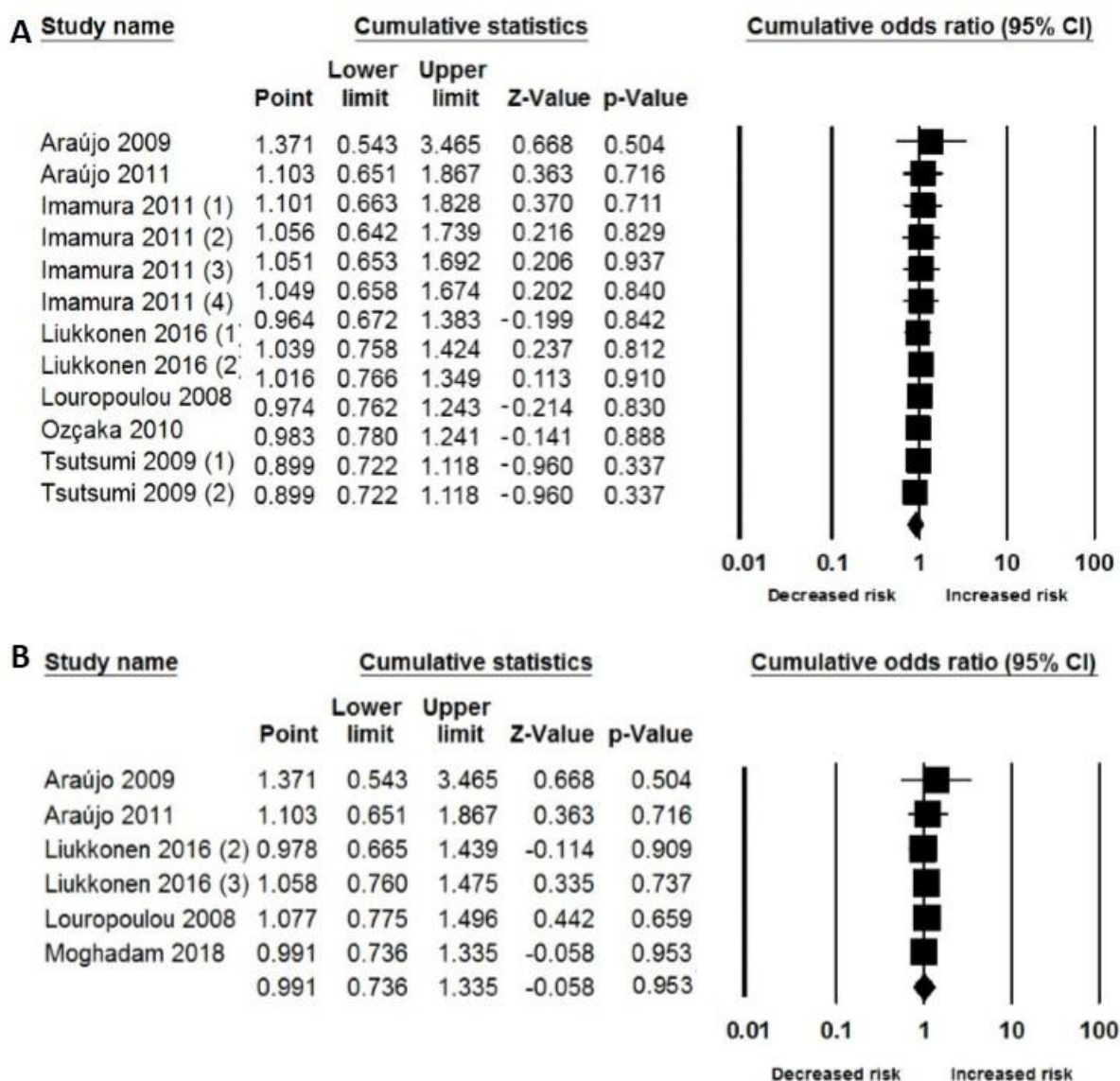
Fonte: Próprio autor

Acerca dos resultados encontrados na nossa metanálise, o polimorfismo rs1800450 e rs1800451 representam a mutação no códon 54 (Gli/Asp, ou alelo B) e no códon 57 (Gli/Glu ou alelo C) (SASTRY et al., 1989). Eles foram mais frequentes, significativamente, em pacientes com baixos níveis de MBL sérico que pacientes com os alelos selvagens (CROSDALE et al., 2000; LEE et al., 2005), especialmente quando combinados na forma de haplótipos com outros polimorfismos no gene MBL-2 (FIGUEIREDO et al., 2016).

Estes baixos níveis séricos de MBL também foram observados em relação a variantes alélicas em pacientes com periodontite (LOUROPOULOU et al., 2008) e pode ser explicados pelos diversos elementos regulatórios presentes no gene MBL-2

o qual alelos polimórficos interferem na formação da tripla hélice da subunidade trimérica do MBL de estrutura normal diminuindo assim a estabilidade da molécula (KALIA et al., 2016).

Figura 5. Análise acumulativa para a metanálise de comparação alélica nos polimorfismos (A) rs1800450 e (B) rs1800451 e o risco de periodontite.



Fonte: Próprio autor

Ambos estes polimorfismos estão frequentemente associados na forma de haplótipos com outras variantes genéticas dentro do gene MBL-2 e geram promotores de alta, intermediária e baixa atividade (BOWMAN; ROEP; ROSS, 2006) que mostram uma variação significativa e resultados contraditórios em relação com os níveis de

MBL (CROSDALE et al., 2000; IP et al., 2004; ÖZKAN et al., 2012). Nos estudos inclusos apenas dois realizaram a medida do MBL sérico para verificar a possível correlação com o genótipo no MBL-2 (LOUROPOULOU et al., 2008; ÖZÇAKA et al., 2010) em que é interessante notar que o genótipo variante homocigoto ou o genótipo heterocigoto foram associados aos baixos níveis de MBL ($P < 0,001$). Contudo, a níveis genéticos não foram observadas associações significativas entre estes polimorfismos o a periodontite na análise geral (Tabelas 1 e 2).

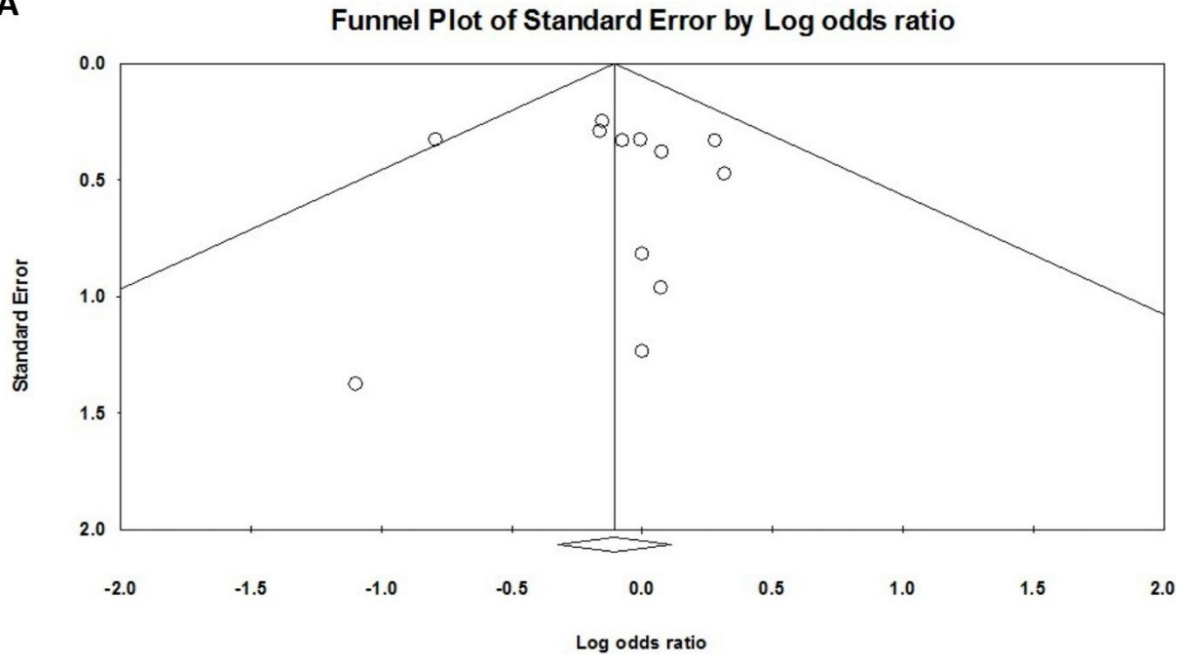
Considerada como uma proteína de fase aguda que promove ativação pela via das lectinas do complemento após se ligar à grupos de açúcar dispostos na superfície de microrganismos, o MBL pode reconhecer os periodontopatógenos. Patógenos relatados com a periodontite tais como as espécies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* são mostrados por terem polissacarídeos ricos em manose em suas paredes celulares (POLEPALLE et al., 2015), e como previamente sugerido, polimorfismos podem influenciar na conformação da proteína MBL e portanto interferir na sua ação (KALIA et al., 2016). Uma explicação para este achado não está exatamente ligado aos aspectos genéticos do MBL-2 e sim na capacidade de evadir-se do sistema imune inato que a espécie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tem (OSCARSSON et al., 2019) ou devido a eficiente degradação do MBL e outros componentes do complemento promovidas pela espécie *Tannerella forsythia* ao liberar específicas metaloproteinases (JUSKO et al., 2012).

Nesta metanálise, dois estudos trouxeram dados sobre pacientes com DM2 (ARAÚJO et al., 2009; 2011). É bem determinado que a periodontite e o DM2 tem uma relação bidirecional em que o controle glicêmico é a chave central para determinar o aumento no risco de desenvolvimento de periodontite (PRESHAW et al., 2012). Por sua vez, DM (tipo 1 ou tipo 2) promove elevado estado inflamatório com aumento nos níveis séricos de IL-6 e TNF- α cujos são responsáveis pela aumentada inflamação no periodonto (BASCONES-MARTINES; MUNOZ-CORCUERA; BASCONES-ILUNDAIN, 2015). Estudos prévios mostraram a importância em avaliar polimorfismos no gene MBL-2, DM e condições infecciosas em que seus achados são úteis para entender o real impacto de variantes genéticas sobre o DM-2 na infecção por

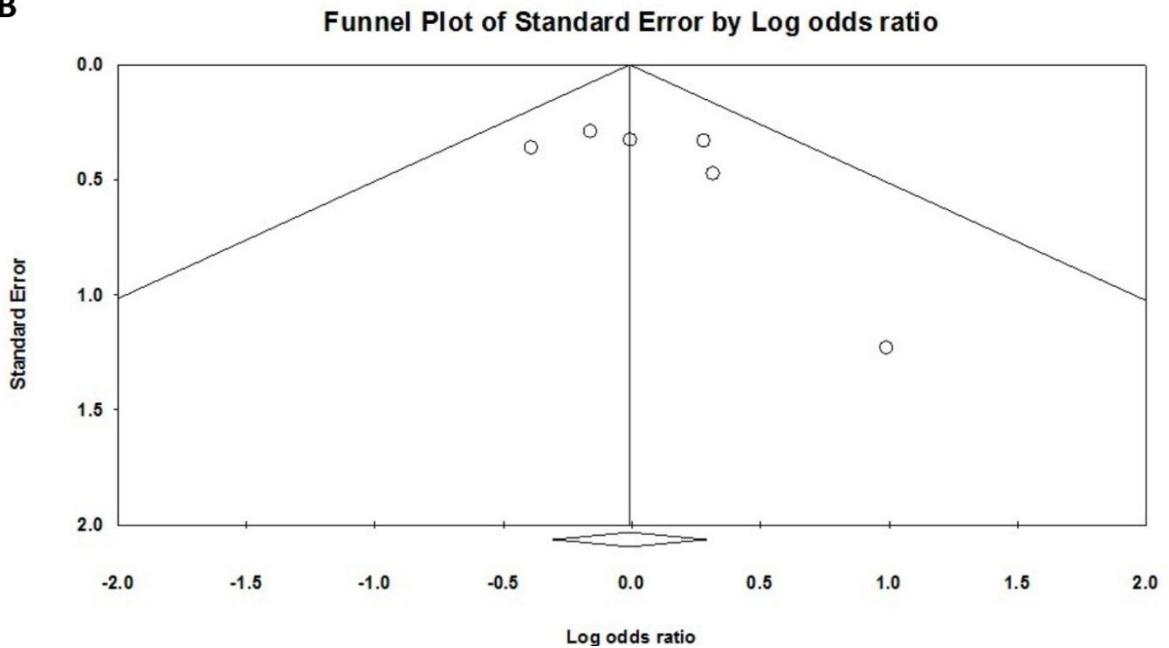
Helicobacter pylori (MORTAZAVI et al., 2017) ou na nefropatia diabética (ZHANG et al., 2013).

Figura 6. *Funnel-plot* de viés de publicação na avaliação alélica nos polimorfismos (A) rs1800450 e (B) rs1800451 e o risco de periodontite.

A



B



Fonte: Próprio autor

Para uma completa avaliação sobre outros fatores que podem influenciar na relação entre os polimorfismos rs1800450 e 1800451 no gene MBL-2 e periodontite, uma análise estratificada com base nos grupos étnicos foi realizada. Os dados sobre Caucasianos e população Miscigenada para o polimorfismo rs1800450 e da população Miscigenada sobre o polimorfismo rs1800451 estão de acordo com a análise geral em que nenhuma associação significativa foi observada (Tabelas 2 e 3). As associações não significativas podem representar a aumenta heterogeneidade no perfil genético da população Miscigenada do Brasil, o qual a população em questão é formada por um grupo de indivíduos caracterizados por elevado grau de mescla genética (KEHDY et al., 2015).

Esta recente metanálise permitiu agregar os resultados disponíveis na literatura sobre os polimorfismos no gene MBL-2 e periodontite com aumentado nível de evidência em que estudos metanalíticos anteriores focaram em diversos participantes da resposta imune mas não o MBL-2 (AMIRISETTY et al., 2015; MATUELLA et al., 2019; SILVA et al., 2017a; 2017b; SILVA et al., 2018; SILVA et al., 2019; YU et al., 2019). Contudo devemos denotar e discutir importantes limitações. Primeiramente, os estudos sobre polimorfismos e formas clínicas da periodontite que já estão em desuso. Caton et al. (2018) dissolveu as formas prévias da periodontite o qual CP e AgP já não existem mais. Futuros estudos devem usar a atual classificação em seus desenhos metodológicos. Segundo, o limitado número de estudos não permitiu que a completa avaliação étnica para as análises de subgrupos. É importante analisar a influência de grupos étnicos para esclarecer as diferentes genéticas em diversas raças e o impacto nos polimorfismos no gene MBL-2 e periodontite. Devido a limitada abordagem étnica nos estudos inclusos, avaliações sobre as populações Africana e Asiática não foram possíveis. Terceiro, uma completa avaliação sobre fatores de ajustamento tais como gênero, fumantes e não fumantes, idade estratificada e dados sobre determinadas condições que influenciam a periodontite não foi possível devido os dados limitados nos estudos. Quarto, a associação entre estes polimorfismos e a periodontite com uma completa avaliação dos níveis de MBL não pôde ser realizada. Essa questão poderia esclarecer a real influência das variantes genéticas no gene MBL-2 e o risco da doença.

Em conclusão, esta recente metanálise composta por oito artigos mostrou a associação não significativa entre os polimorfismos rs1800450 e rs1800451 e o risco de periodontite na avaliação geral e também nas análises de subgrupos ($P > 0,05$).

Referências

Albuquerque DAP, Cavalcanti IT, Vasconcelos LRS, et al. Molecular profile of mannan-binding lectin in hepatitis C patients with MBL gene polymorphisms by a modified mannan-coated nitrocellulose assay. *J Immunol Methods*. 2018;260:101-106.

Amirisetty R, Patel RP, Das S, et al. Interleukin 1 β (+ 3954,- 511 and- 31) polymorphism in chronic periodontitis patients from North India. *Acta Odontol Scand*. 2015;73(5):343-347.

Araújo NC, Bello DMDA, de Souza PRE, et al. Association of Polymorphism of the MBL2 Gene in Type 2 Diabetic Patients with Periodontitis: A Preliminary Study. *Acta Stomatol Croat*. 2009;43(4):290-300.

Araújo NC, Bello DMDA, Crovela S, et al. Mannose binding lectin genes (MBL2) polymorphisms and the periodontal disease in diabetic patients. *Rev Ondont Cien*. 2011;26(3):203-208.

Auriti C, Prencipe G, Moriondo M, et al. Mannose-binding lectin: biologic characteristics and role in the susceptibility to infections and ischemia-reperfusion related injury in critically ill neonates. *J Immunol Res*. 2017;2017.

Balaji SK, Lavu V, Rao S. Chronic periodontitis prevalence and the inflammatory burden in a sample population from South India. *Indian J Dent Res*. 2018;29(2):254.

Bascones-Martines A, Munoz-Corcuera M, Bascones-Ilundain J. Diabetes and periodontitis: a bidirectional relationship. *Med Clin (Barc)*. 2015;145(1):31-35.

Bosshardt DD. The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontol 2000*. 2018;76(1):43-50.

Bouwman LH, Roep BO, Roos A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Hum Immunol*. 2006;67(4-5):247-256.

Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*. 2018;89:S1-S8.

Catunda RQ, Levin L, Kornerup I, et al. Prevalence of Periodontitis in Young Populations: A Systematic Review. *Oral Health Prev Dent*. 2019;17(3):195-202.

Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Links between atherosclerotic and periodontal disease. *Exp Mol Pathol*. 2016;100(1):220-235.

Chou SYH, Lai H, Yen AM, et al. Temporal sequence of the bidirectional relationship between hyperglycemia and periodontal disease: a community-based study of 5,885 Taiwanese aged 35–44 years (KCIS No. 32). *Acta Diabetol*. 2015;52(1):123-131.

- Cieslinski JZ, Goeldner I, Skare TL, et al. Mannose-binding lectin deficiency and miscarriages in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*. 2017;50(7):409-413.
- Crosdale DJ, Ollier WE, Thomson W, et al. Mannose binding lectin (MBL) genotype distributions with relation to serum levels in UK Caucasoids. *Eur J Immunogenet*. 2000;27(3):111-117.
- Degasperi GR, Etchegaray A, Marcelino L, et al. Periodontal disease: General aspects from biofilm to the immune response driven by periodontal pathogens. *Adv Microbiol*. 2018;8(01):1.
- Dobó J, Pál G, Cervenak L, et al. The emerging roles of mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASP s) in the lectin pathway of complement and beyond. *Immunol Rev*. 2016;274(1):98-111.
- Eke PI, Page RC, Wei L, et al. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol*. 2012;83(12):1449-1454.
- Eke PI, Thornton-Evans GO, Wei L, et al. Periodontitis in US adults: National health and nutrition examination survey 2009-2014. *J AM Dent Assoc*. 2018;149(7):576-588.
- Figueiredo GG, Cezar RD, Freire NM, et al. Mannose-binding lectin gene (MBL2) polymorphisms related to the mannose-binding lectin low levels are associated to dengue disease severity. *Hum Immunol*. 2016;77(7):571-575.
- Gaudilliere DK, Culos A, Djebali K, et al. Systemic Immunologic Consequences of Chronic Periodontitis. *J Dent Res*. 2019;0022034519857714.
- Gholizadeh P, Pormohammad A, Eslami H, et al. Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog*. 2017;113:303-311.
- Han MX, Ding C, Kyung HM. Genetic polymorphisms in pattern recognition receptors and risk of periodontitis: Evidence based on 12,793 subjects. *Humm Immunol*. 2015;76(7):496-504.
- Imamura Y, Aoki H, Oomori, et al. Polymorphisms of the mannose-binding lectin gene MBL in periodontitis in patients with Down syndrome. *Pediatr Dent J*. 2011;21(1):17-23.
- Ip WK, To YF, Cheng SK, et al. Serum mannose-binding lectin levels and mbl2 gene polymorphisms in different age and gender groups of southern Chinese adults. *Scand J Immunol*. 2004;59(3):310-314.
- Jusko M, Potempa J, Karim AY, et al. A metalloproteinase karilysin present in the majority of *Tannerella forsythia* isolates inhibits all pathways of the complement system. *J Immunol*. 2012;188(5):2338-2349.
- Kalia N, Sharma A, Kaur M, et al. A comprehensive in silico analysis of non-synonymous and regulatory SNPs of human MBL2 gene. *Springerplus*. 2016;5(1):811.
- Kehdy FS, Gouveia MH, Machado M, et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(28):8696-8701.

- Könönen E, Gursoy M, Gursoy UK. Periodontitis: A multifaceted disease of tooth-supporting tissues. *J Clin Med*. 2019;8(8):1135.
- Koshy B, Rees JS, Farnell DD, et al. Array analysis for T-cell associated cytokines in gingival crevicular fluid: Identifying altered profiles associated with periodontal disease status. *J Dent*. 2019;85:39-46.
- Lauritano D, Martinelli M, Mucchi D, et al. Bacterial load of periodontal pathogens among Italian patients with chronic periodontitis: A comparative study of three different areas. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2016;30(2):149-54.
- Lee SG, Yum JS, Moon HM, et al. Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population. *Mol Immunol*. 2005;42(8):969-997.
- Lee YH. Meta-analysis of genetic association studies. *Ann Lab Med*. 2015;35(3):283-287.
- Liukkonen A, He Q, Gürsoy UK, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism in relation to periodontal infection. *J Periodontal Res*. 2017;52(3):540-545.
- Louropoulou A, Van Der Velden U, Schownmaker T, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2008;35(11):923-930.
- Mattuella LG, Bernardi L, Zambra FMB, et al. Human leukocyte antigen-G polymorphisms in periodontitis. *Acta Odontol Scand*. 2019:1-5.
- Moghadam SA, Bazi A, Miri-Moghaddam M, et al. . Mannose binding lectin-2 gene functional polymorphisms in chronic periodontitis patients; a report from Iran. *Meta Gene*. 2018;17:128-131.
- Moher D, Shamseer L, Clarke M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev*. 2015;4(1):1.
- Mortazavi E, Eslami B, Aghahosseini P, et al. Association of mannose-binding lectin rs1800450 and tumor necrotic factor- α rs1800620 polymorphism with *Helicobacter pylori* in type II diabetes mellitus. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2017;36(5):236-241.
- Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic disease and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017;11(2):72.
- Nedovic B, Posteraro B, Leoncini E, et al. Mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism and vulvovaginal candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
- Nibali L. Suggested guidelines for systematic reviews of periodontal genetic association studies. *J Clin Periodontol*. 2013;40(8):753-756.
- Oscarsson J, Claesson R, Lindholm M, et al. Tools of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* to evade the host response. *J Clin Med*. 2019;8(7):1079.

Özçaka O, Biçakci N, Nalbantsoy A, et al. Association between mannose-binding lectin levels and gene polymorphisms in chronic periodontitis and response to treatment. *Arch Oral Biol.* 2010;55(3):235-241.

Özkan H, Köksal N, Çentinkaya M, et al. Serum mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and low MBL levels are associated with neonatal sepsis and pneumonia. *J Perinatol.* 2012;32(3):210.

Polepalle T, Moogala S, Boggarapu S, et al. Acute phase proteins and their role in periodontitis: a review. 2015;9(11):ZE01.

Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia.* 2012;55(1):21-31.

Romano F, Perotto S, Castiglione A, et al. Prevalence of periodontitis: misclassification, under-recognition or over-diagnosis using partial and full-mouth periodontal examination protocols. *Acta Odontol Scand.* 2019;77(3):189-196.

Ruseva M, Kolev M, Dagnaes-Hansen F, et al. Mannan-binding lectin deficiency modulates the humoral immune response dependent on the genetic environment. *Immunology.* 2009;127(2):279-288.

Sastry K, Herman GA, Day L, et al. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *J Exp Med.* 1989;170(4):1175-1189.

Scorza M, Liguori R, Elce A, et al. Biological role of mannose binding lectin: From newborns to centenarians. *Clin Chim Acta.* 2015;451:78-81.

Silva FRP, Leal ALAB, Galeno JG, et al. Non-significant association between -330 T/G polymorphism in interleukin-2 gene and chronic periodontitis: findings from a meta-analysis. *BMC Oral Health.* 2019. [Under Review]

Silva FRP, Pessoa LS, Vasconcelos ACCG, et al. Polymorphisms in interleukins 17A and 17F genes and periodontitis: results from a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2017;44(6):443-453.

Silva FRP, Vasconcelos ACCG, França LFC, et al. Association between the rs1143634 polymorphism in interleukin-1B and chronic periodontitis: Results from a meta-analysis composed by 54 case/control studies. *Gene.* 2018;668:97-106.

Silva FRP, Vasconcelos ACCG, França LFC, et al. Relationship between-889 C/T polymorphism in interleukin-1A gene and risk of chronic periodontitis: Evidence from a meta-analysis with new published findings. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017;22(1):e7.

Thaiss CA, Levy M, Itav S, et al. Integration of innate immune signaling. *Trends Immunol.* 2016;37(2):84-101.

Trikalinos TA, Salanti G, Zintzaras E, et al. Meta-analysis methods. *Adv Genet.* 2008;60:311-334.

Tsutsumi A, Kobayashi T, Ito S, et al. Mannose binding lectin gene polymorphism and the severity of chronic periodontitis. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2009;32(1):48-52.

Vasconcelos DFP, da Silva FRP, Santana LDAB, et al. Decrease of pericytes is associated with liver disease caused by ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2017;88(2):e49-e57.

Virto L, Cano P, Jiménez-Ortega V, et al. Obesity and periodontitis: An experimental study to evaluate periodontal and systemic effects of comorbidity. *J Periodontol*. 2018;89(2):176-185.

Winning L, Linden GJ. Periodontitis and systemic disease. *BDJ Team*. 2015;2:151-163.

Winning L, Linden GJ. Periodontitis and systemic disease: association or causality?. *Curr Oral Health Rep*. 2017;4(1):1-7.

Xue J, Liu AH, Zhao B, et al. Low levels of mannose-binding lectin at admission increase the risk of adverse neurological outcome in preterm infants: a 1-year follow-up study. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016;29(9):1425-1429.

Yu X, Zong X, Pan Y. Associations between vitamin D receptor genetic variants and periodontitis: a meta-analysis. *Acta Odontol Scand*. 2019:1-11.

Zhang N, Zhuang M, Ma A, et al. Association of levels of mannose-binding lectin and the MBL2 gene with type 2 diabetes and diabetic nephropathy. *PLoS One*. 2013;8(12):e83059.

ANEXO II

6.1 Artigo V

CLINICAL AND EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS



Available online at www.sciencerepository.org

Science Repository

Review Article

Two-Way Relationship Between Helicobacter Pylori Infection and Periodontitis: Results from A Systematic Review and Meta-Analysis

Felipe Rodolfo Pereira da Silva^{1*}, Reyce dos Santos Koga², Zinalton Gomes de Andrade², Larissa dos Santos Pessoa³, Juliana Gomes Galeno^{1,4}, Alessandro Luiz Araújo Bentes Leal², Any Carolina Cardoso Guimarães Vasconcelos^{1,5}, Daniel Fernando Pereira Vasconcelos^{3,4}, Sylvania Conceição Furtado^{1,2} and José Fernando Marques Barcellos^{1,2}

¹Doctorate Student Post-Graduation Program in Basic and Applied Immunology, Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil

²Department of Morphology Biological Sciences Institute, Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil

³Department of Biomedicine, Laboratory of Histological Analysis and Preparation, Federal University of Piauí, Parnaíba, Brazil

⁴Department of Periodontology, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

⁵Department of Study and Research Methods, Medicine School, Education Institute of Parnaíba Valley (IESVAP), Parnaíba, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received: 2 January, 2020

Accepted: 17 January, 2020

Published: 23 January, 2020

Keywords:

Periodontal disease
gastrointestinal tract
odds ratio
periodontal medicine
risk factor

ABSTRACT

Aim: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection and periodontitis have considerable worldwide prevalence once they both present systemic alterations with a possible association between them. Therefore, we have performed this meta-analysis to assess the possible association between *H. pylori* infection and periodontitis.

Material and Methods: A systematic search in the literature was performed for studies published before December 2, 2019 in diverse scientific and educational databases. The data was extracted by two investigators and the statistical analysis was performed by Review Manager statistical program with heterogeneity and Odds Ratio (OR) with 95% of Confidence Intervals (CI) calculations as well as a sensitive analysis to assess the accuracy of the results. The value of $P < 0.05$ was considered as significant. In addition, we performed the analysis of the quality of included studies as well as the evaluation for risk of bias.

Results: In overall analysis, *H. pylori* infection was associated with the risk of periodontitis development (OR = 1.72, CI: 1.47, 2.02, $P < 0.00001$) and the periodontitis was considered as a risk factor for *H. pylori* infection (OR = 3.21, CI: 2.31, 4.47, $P < 0.00001$). Moreover, the evaluation of dental plaque from patients with periodontitis revealed increased risk of *H. pylori* infection (OR = 3.46, CI: 2.39, 5.01, $P < 0.00001$).

Conclusions: This current systematic review and meta-analysis composed by 12 studies in 7,059 participants showed that *H. pylori* infection increased significantly the risk of the development of periodontitis and the periodontitis may be a risk for this bacterial infection.

Introduction

Helicobacter pylori (*H. pylori*) are gram-negative, spiral-shaped and microaerophilic microorganisms that colonize the human gastric- intestinal tract, specifically the stomach [1]. This bacteria species is commonly transmitted by oral-fecal way within family since early childhood with possibly persistence for decades in the gastric mucosa despite the host immune response [2]. This microorganism is already associated with several gastric disorders from gastritis to gastric cancer [3, 4]. In the medical clinic scenario, several types of diagnostic methods are available to detect *H. pylori* infection, such as: histological evaluation, Rapid Urease Test (RUT), molecular technics, serological kits and culture [5-7].

H. pylori infection also was associated with several others extra gastric conditions [8]. Studies available in literature report the relationship among *H. pylori* infection and heart failure hepatic insulin resistance pregnancy-related disorders and oral diseases [9-12]. Results from a meta-analysis showed a significant association between halitosis and *H. pylori* present in stomach with an Odds Ratio value of 4.03 [13].

In the field of oral diseases, there is the periodontitis, characterized as an immune-inflammatory disease as response to the presence of microorganisms in periodontal sites [14]. The pathogenesis of periodontitis receives influence of several factors including the colonization of periodontal sites by gram-positive and gram-negative bacteria species oral hygiene and genetic variations [15-19]. Both periodontitis and *H. pylori* infection had considerable worldwide prevalence and are associated with systemic conditions [8, 20-23].

In a recent case-control study, the possible association between *H. pylori* infection and risk of periodontitis was demonstrated which the *H. pylori* infection has represented an exposure influencing the outcome of periodontitis [24]. Indeed, others previous studies also have evaluated this association as well as have demonstrated the considerable prevalence of this microorganism in oral cavity [25-27]. However, other authors showed the inverse relationship, which the periodontal inflammation with the presence of *H. pylori* infection in periodontal pockets is indicated as source of the microorganism maintenance in human body and in the recurrence of gastric disorders

even after an antibiotic therapy [25].

Up to the present moment, there has not been a study that gathered the results about *H. pylori* infection and periodontitis with an increased power of statistical association and which have demonstrated the real relationship between these two conditions. Given the lack of this information, this study aimed at performing a meta-analysis to assess the possible association between *H. pylori* infection and the risk of periodontitis based on case-control studies, observational studies or cross-sectional studies.

Material and Methods

This systematic review and meta-analysis is registered in PROSPERO database with the following ID number: CRD42017073192.

I Clinical Question Research

What are the real risk and association between *Helicobacter pylori* infection and periodontitis? May *Helicobacter pylori* infection be a risk for periodontitis or is periodontitis correlated with *Helicobacter pylori* infection?

II PICO Statement

The PICO statement used was the following [28]:

P – *Patients, problem or population*: Positive patients for *H. pylori* infection, patients diagnosed with periodontitis and healthy periodontal controls.

I – *Intervention*: Collection of the frequency of *H. pylori* infection between patients with periodontitis and control groups.

C – *Comparison*: The influence between the presence of *H. pylori* and periodontitis

O – *Outcome*: Odds Ratio calculation to measure the association between *H. pylori* infection and periodontitis and to assess the periodontitis as risk for *H. pylori* infection.

III Protocols Used

This meta-analysis followed the recommended PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) statement [29]. The screened studies were evaluated by Newcastle-Ottawa scale for quality assessment studies with score < 7 were excluded [30]. This study (systematic review and meta-analysis) does not require approval by ethics committee.

IV Eligibility Criteria

Articles were included in the current meta-analysis if the studies met all the following criteria: 1) Evaluation of *Helicobacter pylori* infection with occurrence of periodontitis in humans; 2) Case patients received diagnosis of chronic, aggressive periodontitis or localized aggressive periodontitis and control patients had healthy periodontal evaluation; 3) Diagnosis of the periodontitis confirmed through clinical manifestations or radiographic findings as previously described and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection confirmed by previous accurate methods and; 4) participants enrolled: analysis did not present pregnancy or previous systemic disorders such as diabetes or auto-immunity disease [5, 6, 31].

V Search Strategy

A comprehensive search in literature was performed by two investigators for studies that approached the association between *H. pylori* infection and periodontal disease. Google Scholar, MedLine, PubMed and Web of Science were the medical and scientific databases used in the literature retrieval. The following combined keywords or Medical Subject Headings (MeSH) were used: [(*Helicobacter pylori* or *H. pylori*)] and [(infection, gastric disorder)] and (periodontitis or periodontal disease or chronic periodontitis or aggressive periodontitis)]. There was no language restriction in the search strategy that approached studies published before December 2, 2019. The abstracts from included studies, as well as their references, were screened by investigators to identify potential additional studies.

VI Data Collection Process

Two investigators (FRPS and JGG) independently reviewed all studies and

extracted the data using a standardized form. The data were collected on the first author, year of publication, study design, sample size, country, source of sample, method of detection of *H. pylori* infection and obtained score to assess the quality of included studies.

vii Statistical Analysis

The statistical analysis of the data was performed with the Review Manager software version 5.3 (RevMan, Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2012). The chi-squared Q-based statistical test (I^2) was used to assess the presence of heterogeneity with evaluation of the Funnel plot for heterogeneity. When the value of I^2 was not statistically significant ($I^2 < 50\%$, $P > 0.05$) the Fixed-effect model was used to estimate the pooled Odds Ratio (OR). On the other hand, when heterogeneity was significant ($I^2 > 50\%$, $P < 0.05$) the Random-effects model was used for the OR calculation. In both methods, the P value

$< .05$ was considered statistically significant. In addition, a sensitivity analysis was also performed to test the robustness of the results pooled by omitting one included study at a time to detect individual effects on the overall analyses and the risk of bias were assessed by use of the Cochrane Collaboration's tool [32]. All the data in the studies were dichotomous data expressed as OR with 95% of confidence intervals (CI) to assess the association between *H. pylori* infection and periodontitis.

Results

I Characteristics of Studies Included in the Systematic Review

The PRISMA checklist for this current systematic review and meta-analysis is available as supplementary material (Table S1). At the end of the systematic search, 11 articles [12, 25-26, 33-39] met the inclusion criteria and, therefore, composed the meta-analysis (Figure 1). One article stratified the results in two different PCR methods for *H. pylori* diagnosis. Seen this data, we considered that this article was composed by two studies. Therefore, this current systematic review brings 11 articles with 12 studies.

The studies were published between 2003 and 2016 and enrolled 7,059 participants. Diverse ethnical groups composed the studies and the patients were enrolled both in a Hospital-based population and a Community-based population [12, 24-26, 33-39]. The studies used four types of diagnosis methods for *H. pylori* detection: Rapid Urease test (RUT) Serological test to antibody against the bacteria Polymerase Chain Reaction (PCR) and saliva *H. pylori* antigen test (HPS) [12, 24, 25, 33-35, 37-39]. Three studies focused in to assess the *H. pylori* infection as potential risk factor for periodontitis [12, 24, 33]. On the other hand, eight studies were conducted to clarify the periodontitis as risk factor for *H. pylori* infection [25, 26, 34-39]. All studies presented more than seven points in the score scale and were included in the results. The Table 1 shows the main characteristics of the included studies.

Table 1: Characteristics of included studies in this systematic review and meta-analysis.

First author	Year	Sample size (Cc/Co)		Country	Source of sample	Method of detection	Subject type	Score
Al Asquah	2009	HP+	HP-	Saudi Arabia	Hospital	RUT	Dental plaque - Stomach	8
Anand	2006	37/13	25/26	India	Community	RUT and Serological test	-	9
Ding	2015	541/73	312/62	China	Hospital	HPS	-	8
Dye	2002	30/35	20/49	United States	Community	Serological test	Whites – Blacks – Mexican	9
Navabi	2010	189/951	463/3,981	Iran	Hospital	RUT	Men - Women	8
Nisha	2016	23/17	12/13	India	Community	RUT	-	8
Silva	2010	209/136	84/71	Brazil	Hospital	PCR	-	7
Souto	2008	12/1	50/30	Brazil	Community	PCR	-	9
Umeda	2003	39/4	130/52	Japan	Hospital	PCR	-	8
Yang	2016	7/1	10/10	China	Hospital	RUT, culture and PCR	-	8
Zheng and Zhou (1)	2015	50/20	24/46	China	Hospital	PCR	-	8
Zheng and Zhou (2)	2015	25/45	9/61	China	Hospital	PCR	-	8

Cc – Case patients for periodontitis, Co – Control patients, HP+ – *Helicobacter pylori*-positive patients, HP- – *Helicobacter pylori*-negative patients, RUT- Rapid Urease Test kit, HPS – saliva *Helicobacter pylori* antigen test, PCR – Polimerase Chain Reaction

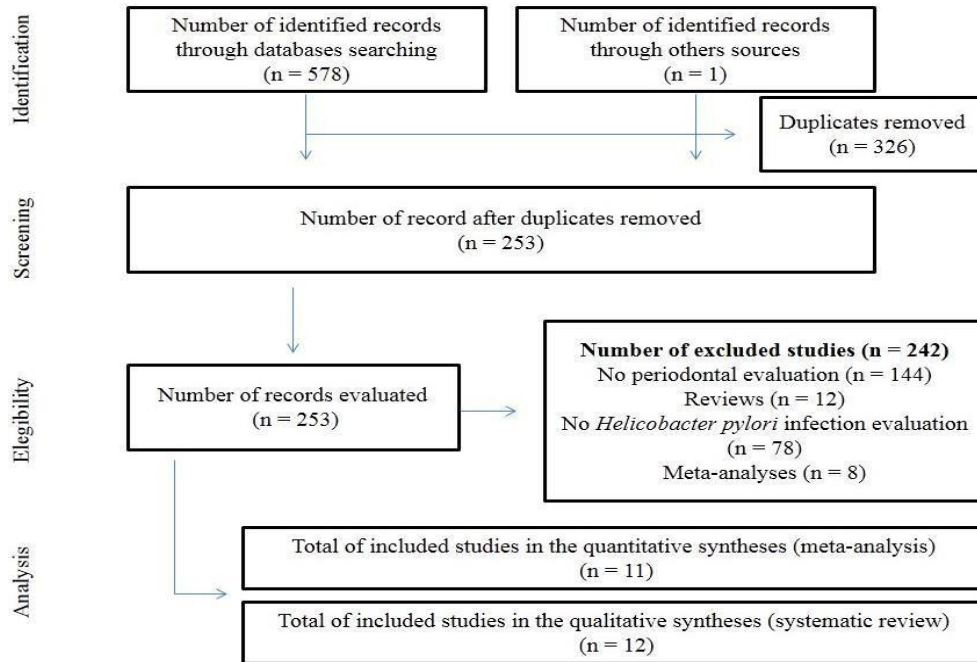


Figure 1: Flowchart for identification, screening, eligibility and analysis of included studies in this current meta-analysis.

Meta-Analysis

The presence of *H. pylori* was associated with the risk of periodontitis development in overall analysis (OR = 1.72, CI: 1.47, 2.02, P<0.00001) with non-significant value of heterogeneity ($I^2 = 36\%$, P = 0.21). Similar results were observed when periodontitis was evaluated as risk factor for

H. pylori infection (OR = 3.21, CI: 2.31, 4.47, P<0.00001) also with a non-significant value of heterogeneity ($I^2 = 0\%$, P = 0.51). The evaluation of dental plaque from patients with periodontitis revealed increased risk of *H. pylori* infection (OR = 3.46, CI: 2.39, 5.01, P<0.00001) with decreased value of heterogeneity ($I^2 = 0\%$, P = 0.59). Due to the non-significant value of heterogeneity in the included calculations, the Fixed-effect statistical model was applied (Figure 2).

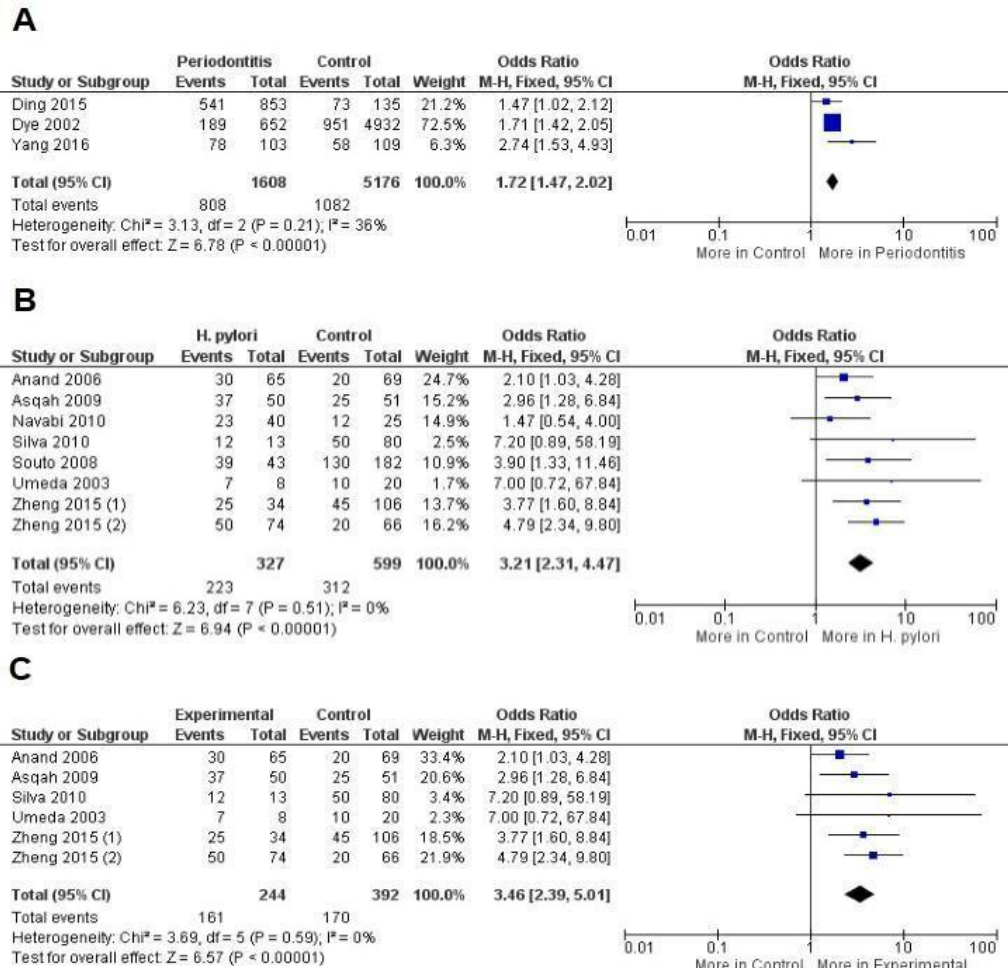


Figure 2: A) Forest plot to comparison between patients with periodontitis and control to *H. pylori* infection in overall analysis, B) Periodontitis as risk factor for *H. pylori* infection and C) Dental plaque from patients with periodontitis and *H. pylori* infection.

II Sensitive Analysis and Risk of Bias

The sensitive analysis showed that the study performed by Nisha et al. changed significantly the results in which considerable increase in heterogeneity was observed

($I^2 = 55\%$, $P_{heterogeneity} = 0.02$) [38]. When this study was excluded the heterogeneity has decreased to be unremarkable ($I^2 = 0\%$, $P_{heterogeneity} = 0.51$). Therefore, 11 studies have participated of the meta-analysis calculations. The risk of bias summary based in the Cochrane Collaboration's tool was showed in (Figure 3), in which all included studies failed to approach the several types of periodontitis classifications and, so, they presented elevated risk of others bias.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first meta-analysis to focus on the association between *H. pylori* and periodontitis as a two-way relationship. Some meta-analyses focused on determining the association between *H. pylori* infection and extra gastric disorders such as: diabetes or halitosis [13, 40]. However, a specific two-way association between *H. pylori* infection and periodontitis by a complete meta-analysis has never been in the literature so far. Our meta-analysis showed that *H. pylori* might increase the risk of periodontitis development (Figure 2). *H. pylori* are a known microorganism that cause gastro-intestinal disturbances [3, 4]. The studies showed the capacity of

H. pylori to promote stimulation to release interleukin-8 and a specific group of proteins associated with the periodontitis progression [41]. Although some authors suggested that this bacterial species might be in a commensal relation with the human body when present in the oral cavity, other subsequent study showed that *H. pylori* has an important role in oral disturbances [42, 43]. *H. pylori* may induce periodontal inflammation by the creation of antigen-antibody complexes who infiltrate in the gingival sulcus with periodontal inflammation [44].

On the other hand, the own periodontitis may be a risk factor for *H. pylori* infection (OR = 3.21, $P < 0.00001$). Results from a previous meta-analysis demonstrated that the periodontal therapy appears to reduce the gastric *H. pylori* recurrence [45]. Besides, other data available in the literature demonstrated that the dental plaque control was effective in preventing *H. pylori* to induce gastric disease [45, 46]. Despite these findings, *H. pylori* were detected more in supragingival plaque rather than in subgingival plaque, what may be signal that this bacterium species does not commonly colonize the periodontal pockets [37]. These authors are according with our results that demonstrated the increased risk of *H. pylori* infection in dental plaque from patients with periodontitis (Figure 2). The dental plaque is a biofilm that adheres to teeth as well as others surfaces in the oral cavity promoting an interesting advantage

composed by the resistance to host immune response; Therefore, *H. pylori* as biofilm-associated is protected from host immune response and systemic antibiotics therapy [47].

Taken in base the evaluation by ethnicity, six studies performed the evaluation of *H. pylori* infection and periodontitis in Asian ethnicity, more specifically in India China and Japan and two studies were carried out among Brazilians [12, 24, 25, 34, 35, 37-39]. Anand et al. evaluated 134 subjects to assess the relationship between oral conditions and *H. pylori* infection. They detected 65 patients positive for *H. pylori* infection and 46.2% of these patients had periodontitis. *H. pylori* infection already had a significant prevalence in this population [48]. The high prevalence of *H. pylori* infection, as well as periodontitis, in populations from Asian and South America leads us to pay more attention in our results seen the limited number of included studies that have been performed in these aforementioned populations [20, 49].

This is the first meta-analysis focused on assessing the association between *H. pylori* infection and periodontitis, in which the results may be considered accurate by non-significant heterogeneity in the performed analyses. However, the meta-analysis has presented some important limitations that should be noted. First, 11 studies composed the results. Although a considerable number of patients was enrolled (Table 1), more studies are required to better evaluating the association between this bacterial infection and periodontitis. Second, *H. pylori* not only are present in patients that manifest gastric symptoms, but also in asymptomatic infected health patients [50]. Hence, the patients with periodontitis may be not diagnosed to *H. pylori* infection and therefore are not included in the studies. Third, periodontitis itself has notable variations in clinical manifestations, diagnosis and therapeutic approaches; insufficient data brought by included studies did not enable a better evaluation due to such characteristics and may represent a potential bias as showed in (Figure 3). Fourth, two relationships have been approached in the included studies: whether the presence of *H. pylori* may influence in periodontitis, taken this disease as an outcome or whether periodontitis may be a cause of infection or reinfection by *H. pylori*.

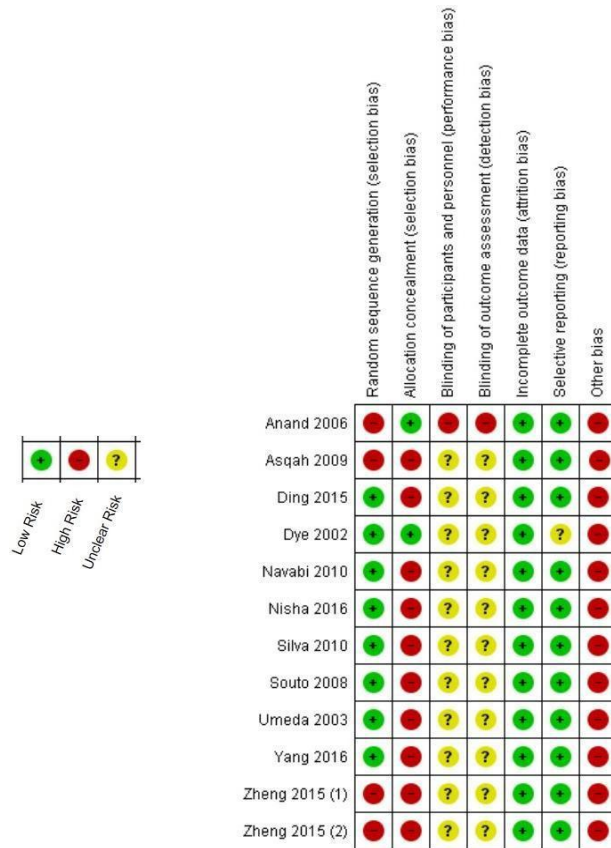


Figure 3: Risk of bias summary: review authors' judgments about each risk of bias item for each included study.

We tried to considerate this question. However, future studies should be focused on assessing the prevalence of *H. pylori* infection among patients with periodontitis and on the health periodontal evaluation assessing whether both groups present gastric alterations. Moreover, further researches should perform the evaluation of *H. pylori* infection as an exposure to periodontitis and the inverse evaluation. Fifth, periodontitis is a heterogeneous inflammatory condition that receives as environmental influence as host genetic conditions [15-19, 51, 52]. In conclusion, this current systematic review and meta-analysis composed by 12 studies in 7,059 participants showed that *H. pylori* infection is associated with periodontitis and the disease may be considered as a risk factor for *H. pylori* infection.

References

1. Lopes AL, Vale FF, Oleastro M. Helicobacter pylori infection – recent developments in diagnosis. World J Gastroenterol 2014;20:9299-9313.

2. Salama NR, Hartung ML, Müller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:385-399.
3. Watari J, Chen N, Amenta OS, et al. *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. *World J Gastroenterol* 2014;20:5461:5473.
4. Graham DY. *Helicobacter pylori* update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits. *Gastroenterology* 2015;148:719-731.
5. Garza-González E, Perez-Perez GI, Maldonado-Garza HJ, et al. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World J Gastroenterol* 2014;20:1438-1449.
6. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard?. *World J Gastroenterol* 2014;20:12847-12859.
7. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: current options and developments. *World J Gastroenterol* 2015;21:11221-11235.
8. Franceschi F, Gasbarrini A, Polyzos SA, et al. Extragastric diseases and *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2015; 40-46.
9. Matsushima S, Tsuda M, Matsumoto J, et al. Association of *Helicobacter Pylori* with Chronic Heart Failure. *J Card Fail* 2016;2:S181.
10. Zhou X, Liu W, Gu M, et al. *Helicobacter pylori* infection causes hepatic insulin resistance by the c-Jun/miR-203/SOCS3 signaling pathway. *J Gastroenterol* 2015;50:1027-1040.
11. Cardaropoli S, Rolfo A, Todros T. *Helicobacter pylori* and pregnancy-related disorders. *Word J Gastroenterol* 2014;20:654-664.
12. Ding YJ, Yan TL, Hu XL, et al. Association of salivary *Helicobacter pylori* infection with oral diseases: a cross-sectional study in a Chinese population. *Int J Med Sci* 2015;12:742-747.
13. Dou W, Li J, Xu L, et al. Halitosis and *helicobacter pylori* infection: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e4223.
14. Knight ET, Liu J, Seymour GJ, et al. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2016;71:22-51.
15. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2015;15:30-44.

16. Lertpimonchai A, Rattanasiri S, Arj-Ong Vallibhakara S, et al. The association between oral hygiene and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Dent J* 2017;67:332-343.
17. Marchesan JT, Jiao Y, Moss K, et al. Common polymorphisms in the IFI16 and AIM2 genes are associated with periodontal disease. *J Periodontol* 2017;88:663-672.
18. Silva FRP, Vasconcelos ACCG, França LFC, et al. Relationship between -889 C/T polymorphism in interleukin-1A gene and risk of chronic periodontitis: evidence from a meta-analysis with new published findings. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2017;22:e7-e14.
19. Silva FRP, Pessoa LS, Vasconcelos, ACCG, et al. Polymorphisms in interleukins 17A and 17F genes and periodontitis: results from a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2017;44:443-453.
20. Susin C, Haas AN, Albandar JM. Epidemiology and demographics of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 2014;65:27-45.
21. Eusebi, LH, Zagari RM, Bazzoli, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2014;19:1-5.
22. França LFC, Vasconcelos ACCG, Silva FRP, et al. Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. *J Clin Periodontol* 2017;44:568-576.
23. Vasconcelos DFP, Silva FRP, Pinto MSC, et al. Decrease of pericytes is associated with liver disease caused by ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2017;88:e49-e57.
24. Yang J, Zhang Q, Chen M, et al. Association between *Helicobacter pylori* infection and risk of periodontal diseases in Han Chinese: a case-control study. *Med Sci Monitor* 2016;22:121-126.
25. Anand OS, Nadakumar K, Shenoy KT. Are dental plaque, poor oral hygiene, and periodontal disease associated with *Helicobacter pylori* infection?. *J Periodontol* 2006;77:692-698.
26. Al Asqah M, Al Hamoudi N, Anil S, et al. Is the presence of *Helicobacter pylori* in the dental plaque of patients with chronic periodontitis a risk factor for gastric infection?. *Can J Gastroenterol* 2009;23:177-179.

27. Gebara EC, Pannuti C, Faria CM, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:277-280.
28. University Library [Internet]. Chicago: The University of Illinois at Chicago's Library; [cited 2018 Jun 23]. Available from: <http://researchguides.uic.edu/c.php?g=252338&p=3954402>.
29. Moher D, Liberatti, A, Tetziaff J, et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* 2009;6:e1000097.
30. Ottawa Hospital Research Institute [Internet]. Ottawa: Weels G, Shea B, O'Connell D, et al. [cited 2018 Jun 25]. Available from: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp.
31. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol* 2007;78:1387-1399.
32. Higgins JPT, Altman DG. Assessing risk of bias in included studies. In: Higgins JPT, Green S, eds. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. Wiley, 2008; 187-241
33. Dye BA, Kruszon-Moran D, McQuillian G. The relationship between periodontal disease attributes and *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. *Am J Public Health* 2002;92:1809-1815.
34. Umeda M, Kobayashi H, Takeuchi Y, et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. *J Periodontol* 2003;74:129-134.
35. Souto R, Colombo AP. Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. *J Periodontol* 2008;79:97-103.
36. Navabi N, Darvismoghadam S, Torabi M. Association between gastric *Helicobacter pylori* infection and periodontal disease. *J Dent (Shiraz)* 2010;10:45-49.
37. Silva DG, Stevens RH, Macedo JM, et al. Presence of *Helicobacter pylori* in supragingival dental plaque of individuals with periodontal disease and upper gastric diseases. *Arch Oral Biol* 2010;55:896-901.
38. Nisha KJ, Nandakumar K, Shenoy KT, Janam P. Periodontal disease and *Helicobacter pylori* infection: a community-based study using serology and rapid urease test. *J Investig Clin Dent* 2016;7:37-45.

39. Zheng P, Zhou W. Relation between periodontitis and helicobacter pylori infection. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:16741.
40. Zhou X, Zhang C, Wu J, et al. Association between Helicobacter pylori infection and diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetes Res Clin Pract* 2013;99:200-208.
41. Hu Z, Zhang Y, Li Z, et al. Effect of Helicobacter pylori infection on chronic periodontitis by the change of microecology and inflammation. *Oncotarget* 2016;7:66700-66712.
42. Song Q, Haller B, Ulrich D, Wichelhaus A, Adler G, Bode G. Quantitation of Helicobacter pylori in dental plaque samples by competitive polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 2000;53:218-222.
43. Loster BW, Majewski SW, Czesnikiewicz-Guzik M, et al. The relationship between the presence of Helicobacter pylori in the oral cavity and gastric in the stomach. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57:91-100.
44. Okuda K, Kimizuka R, Katakura A, et al. Ecological and immunopathological implications of oral bacteria in Helicobacter pylori-infected disease. *J Periodontol.* 2003;74(1):123-128.
45. Bouziane A, Ahid S, Abouqal R, et al. Effect of periodontal therapy on prevention of gastric Helicobacter pylori recurrence: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2012;39(12):1166-1173.
46. Jia CL, Jiang GS, Li CH, et al. Effect of dental plaque control on infection of Helicobacter pylori in gastric mucosa. *J Periodontol.* 2009;80(10):1606-1609.
47. Anand PS, Kamath KP, Anil S. (2014). Role of dental plaque, saliva and periodontal disease in Helicobacter pylori infection. *World J Gastroenterol.* 2014;20(19):5639-5653.
48. Adlekha S, Chadha T, Krishnan P, et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection among patients undergoing upper gastrointestinal endoscopy in a medical college hospital in Kerala, India. *Ann Med Health Sci Res.* 2013;3(4):559-563.
49. Shah N, Mathur VP, Kant S, et al. Prevalence of dental caries and periodontal disease in a rural area of Faridabad District, Haryana, India. *Indian J Dent Res.* 2017;28(3):242-247.
50. Ford A C, Forman D, Hunt RH, et al. (2014). Helicobacter pylori eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMJ.* 2014;348:g3174.