



PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 – St. Universitário
Caixa Postal 86 – CEP 74605-010
Goiânia-Goias
Telefone/Fax: (62)3946-1070 ou 1071
www.pucgoias.edu.br / prope@pucgoias.edu.br

ALUNO:

Thiago Athayde Leite

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA DO ORIENTADOR CADASTRADO NO SIGEP/CP/PROPE:

DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA EM ADULTO – A RELAÇÃO DO POLIMORFISMO DAS INTERLEUCINAS 1 β , 8 E 16.

PLANO DE TRABALHO DO ALUNO

TÍTULO:

A RELAÇÃO DO POLIMORFISMO DAS INTERLEUCINAS 1 β COM A DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA EM ADULTOS

APRESENTAÇÃO:

Presentemente tem-se observado um grande desenvolvimento na área da saúde, verificando-se inúmeras novas metodologias para diagnósticos e tratamentos, os quais em muitos casos se estabeleceram mediante a interação com outras áreas da ciência.

A saúde bucal não é diferente, pode-se observar um quadro semelhante em relação aos avanços na área de ciência e tecnologia. No entanto, à existência de limitações como: a alta abrangência para exames de saúde e de ações terapêuticas, os quais acabam não sendo muito eficazes para todos os grupos de pacientes, tem promovido um aumento de iniciativas de pesquisas direcionadas a individualidade genética visando à especificidade clínica de grupos e indivíduos.

Dentre as manifestações clínica que acometem a saúde bucal a doença periodontal (DP) é bastante frequente sendo a segunda maior causa de patologia dentária na população humana de todo Mundo (PETERSEN, P, E; OGAWA, H, 2005.)

A DP caracteriza-se pela infecção de um agente etiológico, ocasionando um grupo de doenças inflamatórias, incluindo periodontites e gengivite que afeta tecidos de sustentação do dente. A placa bacteriana que acumula entre os dentes e penetra no suco gengival (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1992).



Anais da Semana de Ciência e Tecnologia da PUC Goiás 2013
Disponível em: <http://anais.pucgoias.edu.br/2013/index.html>
ISSN: 2177-3327

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 – St. Universitário
Caixa Postal 86 – CEP 74605-010
Goiânia-Goiás
Telefone/Fax: (62)3946-1070 ou 1071
www.pucgoias.edu.br / prope@pucgoias.edu.br

No entanto, o curso desse processo patológico e a resposta clínica ao tratamento diferem entre pacientes, pois existe uma variabilidade individual na resposta inflamatória diante do desafio microbiológico, a qual é determinada por fatores genéticos ou por sua interação com fatores ambientais, como aqueles relacionados com os hábitos do indivíduo, por exemplo, higiene bucal (CURR OPIN PHARMACOL, 2009).

As interleucinas são agentes funcionais mediadores (citocinas) da resposta inflamatória, contribuem na patogênese de diversas doenças crônicas caracterizadas por processos de reabsorção óssea, como a periodontite, ao estimular a atividade osteoclástica (BURGENER, B, *et al* , 2010; PRESHAW, P, M & TAYLOR, J, J, 2011).

De acordo com Page (1991) o aumento do número de bactérias periodontais na superfície dento-gengival pode resultar na penetração destas e de seus subprodutos nos tecidos gengivais, provocando uma resposta inflamatória com produção de mediadores inflamatórios.

Estudos realizados por Guzman *et al* (2003) confirmaram que somente o genótipo Interleucina-1 β (IL-1 β) está associado com a doença periodontal.

JUSTIFICATIVA:

A doença periodontal é tida como a segunda maior causa de patologia dentária na população mundial. Esta doença é considerada multifatorial e ainda não possui uma total compreensão dos fatores de causa, como os aspectos referentes as características genéticas do indivíduo os quais podem ou não favorecer o desenvolvimento desta patologia.

Ao se investigar a potencial relação entre doença periodontal com o fator da susceptibilidade genética, obtendo-se resultados que permitam esta associação. Logo, poderá apontar-se um diagnostico mais conciso, favorecendo também um prognostico mais confiável para o paciente, proporcionando uma melhor qualidade de vida.

Então, espera-se com este estudo operar clinicamente e preventivamente, nos pacientes que exibirem o fator genético positivo para doença, desenvolvendo um novo método de auxílio ao diagnóstico da doença para que se possa proporcionar uma maior sobrevida aos elementos dentários.



Anais da Semana de Ciência e Tecnologia da PUC Goiás 2013
Disponível em: <http://anais.pucgoias.edu.br/2013/index.html>

PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 – St. Universitário
Caixa Postal 86 – CEP 74605-010
Goiânia-Goiás
Telefone/Fax: (62)3946-1070 ou 1071
www.pucgoias.edu.br / prope@pucgoias.edu.br

OBJETO:

O presente trabalho tem como objeto de estudo a identificação de polimorfismo da interleucina 1 β e a relação desta, com doença periodontal.

OBJETIVOS:

1. Identificar os possíveis polimorfismos para o gene da interleucina 1 β em pacientes com e sem a doença.
2. Relacionar os polimorfismos da interleucina 1 β com a doença periodontal (periodontite) em pacientes adultos verificando se existe suscetibilidade genética.
3. Compreender se existe associação dos diferentes quadros de intensidade da doença com os polimorfismos encontrados.

PROBLEMA:

A doença periodontal possui muitos fatores responsáveis associados, sendo os aspectos genéticos poucos estudados, acredita-se que a existência de polimorfismo em genes de proteínas mediadoras de processos imunológicos estejam associados ao desenvolvimento da periodontite.

Sabemos que a patologia é originada de um agente etiológico específico, porém ainda não se sabe por que os indivíduos do mesmo grupo de risco desenvolvem condições cuja agressividade é distinta.

MÉTODO E PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS:

A avaliação ocorrerá entre dois grupos amostrais, sendo 20 correspondentes as amostras de caso e 20 para as amostras controle, catalogadas segundo a idade e sexo. A priori, a obtenção das amostras, os indivíduos doadores responderam a questionários sobre os hábitos de vida e higiene, que também avaliará as condições biométricas dos participantes.



Anais da Semana de Ciência e Tecnologia da PUC Goiás 2013
Disponível em: <http://anais.pucgoias.edu.br/2013/index.html>
ISSN: 2177-3327

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 – St. Universitário
Caixa Postal 86 – CEP 74605-010
Goiânia-Goiás
Telefone/Fax: (62)3946-1070 ou 1071
www.pucgoias.edu.br / prope@pucgoias.edu.br

Os voluntários doadores terão toda segurança de acompanhamento e assistência caso necessite durante o andamento do estudo, tendo a liberdade em recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem penalidades ou prejuízo ao cuidado com a sua saúde. Há também a garantia do sigilo de dados, que assegura a privacidade dos participantes voluntários quanto às informações confidenciais envolvidas na pesquisa. Os resultados desta pesquisa serão publicados em revistas especializadas.

Para identificação dos polimorfismos do gene de interleucina 1B, as amostras biológicas serão obtidas mediante a coleta de 10mL de sangue periférico em heparina. As amostras serão centrifugadas a 1500 G por 20 minutos e após a centrifugação, alíquotas de plasma, anel leucocitário e hemácias serão preparadas e rotuladas. As frações serão armazenadas no banco de amostras do NPR.

As células do anel leucocitário serão submetidas à extração de DNA com o Kit Wizard® (Promega Corporation, EUA). O DNA total isolado será utilizado para as PCRs para identificar os polimorfismos associados ao gene da interleucina 1B. Os protocolos para as reações de PCR e os protocolos termais serão otimizados a partir dos protocolos sugeridos na literatura. Quando necessário será utilizada a RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), cujos protocolos serão otimizados conforme aqueles descritos na literatura (Mellati *et al.*, 2007; Drożdżik *et al.*, 2006; Folwaczny *et al.*, 2006).

Interleucina 1 β → As seqüências de primers serão:

- 5'-CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA-3'
- 5'-GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG-3'

Condições da PCR: PCR buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.8], 1.5 mM MgCl₂ 50 Mm KCl, 0.1% Triton X-100); 1mM MgCl₂; 0.2 Mm dNTPs; 2.0 U Taq1 polymerase e 2 M de primers.

Condições de termociclagem: 2 ciclos de desnaturação a 95°C por 2 min, anelamento a 67,5°C por 1 min e extensão a 74°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 67.5°C por 1 min e 74°C por 1 min. Finalmente, 3 ciclos de 95°C por 1 min, 67.5°C por 1 min e 74°C por 5 min para completar a ciclagem.



PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 – St. Universitário
Caixa Postal 86 – CEP 74605-010
Goiânia-Goiás
Telefone/Fax: (62)3946-1070 ou 1071
www.pucgoias.edu.br / prope@pucgoias.edu.br

Os produtos de PCR serão avaliados, submetendo-se o DNA a um campo elétrico constante de 10 V/cm em um gel de poliacrilamida de 8% em TBE. A visualização do DNA será obtida através da coloração do gel em solução de brometo de etídio 5 µg/mL ou coloração por nitrato de prata. Será utilizado um Sistema de vídeo-documentação de géis (VDS[®], Amersham Bioscience, EUA) interligado a um microcomputador com Sistema de análise de géis Imagemaster[®] (Amersham Bioscience, EUA).

RFLP: O produto da PCR será digerido com Taq1 at 65°C for 3 h. The resulting products of 12bp+85bp+97bp (alelo 1) and 12bp+182bp (alelo 2) serão separados por eletroforese em gel de agarose a 4%.

Quando necessários, o teste do Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher serão usados para comparação dos resultados entre casos e controles. O teste de regressão linear simples e múltiplo e logístico poderá ser utilizado para determinar possíveis relações e correlações entre as co-variáveis investigadas. Para os cálculos estatísticos serão utilizados softwares de rotina.

RESULTADOS ESPERADOS:

Esperamos identificar os polimorfismos da interleucina 1B, nos indivíduos com a doença, e não identificar nos pacientes não doentes. Verificar a existência de um fator genético relacionado no desenvolvimento da doença periodontal; para se estabelecer um prognóstico conciso para os pacientes doentes.

ATIVIDADES DE ORIENTAÇÃO PREVISTAS PARA SEREM DESENVOLVIDAS PELO ALUNO (Descreva as atividades solicitadas pelo seu orientador).

- Coleta das amostras junto ao Orientador;
- Preparação das amostras;
- Realização das metodologias sob a supervisão do Orientador;
- Análise estatística dos dados;



PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 – St. Universitário
 Caixa Postal 86 – CEP 74605-010
 Goiânia-Goiás
 Telefone/Fax: (62)3946-1070 ou 1071
www.pucgoias.edu.br / prope@pucgoias.edu.br

- Apresentação dos resultados parciais, sob o formato de pôsteres ou palestras, em congressos da área, para equipes da comunidade científica ou acadêmica, permitindo a integração da equipe com outros pesquisadores;
- Discussão em grupo das possíveis implicações dos dados obtidos;
- Participação em congressos nacionais / internacionais;
- Elaborar manuscritos para a publicação em periódicos nacionais e internacionais;
- Elaborar relatório final.

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PLANO DE TRABALHO (Apresente as etapas de seu Plano e o período de realização, de acordo com o cronograma do projeto de pesquisa do orientador).

Atividades	2013					2014				
	Descrição Etapas e Atividades do Estudo									
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Aplicação do questionário aos pacientes		X	X	X	X					
Coleta das amostras biológicas		X	X	X	X					
Preparo das amostras			X	X	X	X	X			
Otimização e realização dos métodos propostos			X	X	X	X	X	X		
Tabulação dos resultados			X	X	X	X	X			
Análise Estatística dos dados				X	X	X	X	X	X	
Discussão em grupo das possíveis implicações dos dados obtidos								X	X	X
Submeter artigos e resumos para apresentar em eventos de genética.									X	X
Relatório Final										X



Anais da Semana de Ciência e Tecnologia da PUC Goiás 2013
Disponível em: <http://anais.pucgoias.edu.br/2013/index.html>
ISSN: 2177-3327

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 – St. Universitário
Caixa Postal 86 – CEP 74605-010
Goiânia-Goiás
Telefone/Fax: (62)3946-1070 ou 1071
www.pucgoias.edu.br / prope@pucgoias.edu.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Burgener B, Ford AR, Situ H, Fayad MI, Hao JJ, Wenckus CS, et al. Biologic markers for odontogenic periradicular periodontitis. *J Endod.* 2010;36(8):1307-10.

Curr Opin Pharmacol. 2009;9(4):370-74.

GUZMAN, S. et al. Association between interleukin-1 genotype an periodontal disease in a diabetic population. *J Periodontol.*v. 74,n. 8, p. 1183-1190, aug. 2003.

PAGE, R. C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontal Res*, v. 26, n. 3, p. 230-242, Mayo 1991.

Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol* 2005 Dec; 76(12):2187-93.

Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol.* 2011;38 Suppl 11:60-84. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01671.x.

Socransky SS, Halfajee AD: The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992: 63: 322-331.

ASSINATURA DO ALUNO:

Goiânia,.....de.....de.....
Assinatura:.....

CIÊNCIA DO ORIENTADOR:

ASSINATURA DO ORIENTADOR:

Goiânia,.....de.....de.....
Assinatura:.....