


UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



FRANCINE VILMA DE OLIVEIRA

INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS NOS
GENES *RANK*, *RANKL* e *OPG* NA PERIODONTITE

Salvador

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DE ÓRGÃOS E SISTEMAS**



FRANCINE VILMA DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES *RANK*,
RANKL e *OPG* NA PERIODONTITE**

Salvador
2021

FRANCINE VILMA DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES *RANK*,
RANKL e *OPG* NA PERIODONTITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª Tatiane de Oliveira Teixeira
Muniz Carletto

Coorientação: Prof^ª. Dr^ª Camila Alexandrina
Figueiredo.

Salvador
2021

Dados internacionais de catalogação na publicação

Oliveira, Francine Vilma de
Influência de variantes genéticas nos genes *RANK*,
RANKL e *OPG* na periodontite./ Manuscrito]. Francine Vilma de Oliveira.
Salvador, 2021.
90 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz Carletto.
Coorientadora: Prof. Dra. Camila Alexandrina Figueiredo.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de
Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos
dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2021.

1. Variante de único nucleotídeo. 2. *RANK*. 3. *RANKL*. 4. *OPG*.
5. **Periodontite** I. Carletto, Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz.
II. Figueiredo, Camila Alexandrina. III. Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciência da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos
Interativos dos Órgãos e Sistemas. IV. Título

CDD – 617.632 21. ed.


FRANCINE VILMA DE OLIVEIRA

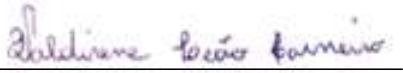
**INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES *RANK*, *RANKL* e *OPG*
NA PERIODONTITE**

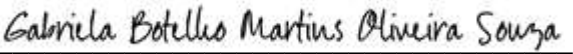
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Salvador, 26 de novembro de 2021.

Banca examinadora

Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz Carletto (Orientadora) 
Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, pela Universidade Federal da Bahia
Universidade Federal da Bahia

Valdirene Leão Carneiro 
Doutora em Imunologia, pela Universidade Federal da Bahia.
Universidade do Estado da Bahia

Gabriela Botelho Martins 
Doutora em Odontologia, pela Universidade Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Universidade Federal da Bahia

Dedico a meus filhos,
Eric de Oliveira Biscoli e Bruno de Oliveira Biscoli,
que me ensinam todos os dias a viver o amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que compartilharam este caminho comigo:

Minha Orientadora, Profa. Tatiane, uma pessoa maravilhosa, que transmite uma alegria contagiante e que está sempre disposta a ensinar, ajudar e compreender! Obrigada por ter aberto as portas para mim e sempre ter me incentivado e me inspirado a superar meus limites!

Minha Coorientadora, Profa. Camila, pelos ensinamentos, pela gentileza e pelo carinho com os quais sempre me tratou.

A Profa. Isabela Barreto, que me apresentou à Profa. Tatiane e fez com que eu tivesse a oportunidade de conhecer essa equipe incrível.

A Profa. Soraya, que contribuiu com o banco de dados do estudo.

Minhas queridas e brilhantes colegas do grupo de Periodontia do Imunobio, Márcia, Jamile e Rachel, que me ensinam muito todos os dias e que estão sempre dispostas a ajudar e a compartilhar seus conhecimentos. Sem vocês não teria chegado até aqui.

A querida colega Yasmin, que foi a primeira aluna do programa PIOS que eu conheci e que sempre compartilhou seus conhecimentos com muita paciência, carinho e amizade.

Minha amiga e colega de profissão, Lívia, que não mediu esforços para me ajudar sempre que precisei e compartilhou seus conhecimentos de Periodontia.

Meus colegas do Programa de Pós-Graduação PIOS, pela troca diária de experiências, conhecimentos e amizade. Mesmo distantes fisicamente, devido à pandemia do coronavírus, permanecemos unidos virtualmente e dando força uns para os outros.

Meus colegas do Laboratório Imunobio, por me ensinarem sempre e nunca medirem esforços para ajudar quando precisei.

Os secretários do Programa, Alyson, Tarcísio e Carlos, por me orientarem sempre que precisei.

Enfim, minha família, meus preciosos filhos Eric e Bruno, que são a luz e a razão dos meus dias. São eles que arrancam o meu sorriso mais sincero e o amor mais puro e verdadeiro. Obrigada por me inspirarem a querer ser sempre uma pessoa melhor.

Meu marido, Micael, que sempre incentivou meus sonhos e me deu todo apoio, compartilhando todas as tarefas da nossa família e me oferecendo seu tempo, seu amor e seus conhecimentos de tecnologia para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Você foi essencial nesse processo.

Meus amados pais, Vitor e Vilma, que me ajudaram a cuidar dos nossos meninos sempre com muita dedicação e amor, para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

Minha irmã Rochelli, que me incentiva e vibra pelas minhas conquistas.

Deus, que sempre me mostra que tudo acontece no tempo Dele, o tempo certo! Obrigada, meu Deus, por cada detalhe da vida linda que o Senhor me permite viver todos os dias.

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas”.

Antoine de Saint-Exupéry

OLIVEIRA, Francine Vilma. **Influência de variantes genéticas nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* na periodontite**. 2021. Orientadora: Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz Carletto. 90 f. il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2022.

RESUMO

Introdução: A periodontite é uma doença inflamatória multifatorial que afeta os tecidos de suporte do dente, podendo levar à perda dental. A interação de complexos bacterianos específicos envolvidos na periodontite, fatores de risco que interferem na resposta imunológica do hospedeiro, incluindo, por exemplo, a regulação celular de fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos, e a suscetibilidade genética e variantes específicas, podem estar associados à doença e à dificuldade do tratamento. O sistema *RANKL/RANK/OPG* está envolvido na diferenciação e ativação dos osteoclastos, regulando as respostas celulares e a reabsorção óssea na periodontite. Variantes genéticas podem influenciar na manifestação desses genes, que têm sido associados a doenças, em diferentes populações. **Objetivos:** Descrever a frequência e o potencial regulatório das variantes do sistema *RANK*, *RANKL* e *OPG*; avaliar o seu potencial como marcadores genéticos informativos de ancestralidade (AIM); avaliar a associação de variantes genéticas em *RANK*, *RANKL* e *OPG* com a presença de periodontite. **Metodologia:** Estudo transversal com 506 indivíduos adultos participantes de uma coorte, acometidos de asma e periodontite. Estes tiveram o DNA genômico extraído e genotipado, utilizando-se a plataforma Illumina Multi-Ethnic Global Array (MEGA, Illumina). As plataformas NCBI, Regulome DB, Haploview 4.2 e rSNPBase foram consultadas e utilizadas. Para as análises de associação, foram classificados com presença (n=117) ou ausência (n=389) de periodontite; e a análise estatística foi realizada com o *software* PLINK 1.9, mediante regressão logística ajustada por idade, obesidade, hábito de respirar pela boca, uso de fio dental, asma e componente principal de ancestralidade. **Resultados:** As variantes mais frequentes na população estudada foram: o rs4941129 em *RANK*, frequência de menor alelo (MAF) 50%; o rs9525641 em *RANKL*, MAF 46% e o rs3102724 em *OPG*, MAF 46%. Os rs 17069898 (1f) em *RANK*, rs2200287 (1d) em *RANKL* e rs3134063 (1f) em *OPG* apresentaram maior impacto funcional. Em *OPG* e *RANK*, nove polimorfismos se caracterizaram como AIM, predominando populações YRI (africanos) e CEU (europeus). Foram associados à periodontite no gene *RANK*, 27 SNV (variante de nucleotídeo único), sendo 20 positivamente (*odds ratio* >1) e 16 deles apresentam alta correlação entre si, variando entre 81% e 100%; e 7 negativamente (*odds ratio* <1) e 2 deles com alta correlação (96%), enquanto 2 em perfeito equilíbrio ($r^2=1,0$). Em *RANKL*, 11 SNV foram associados positivamente à periodontite, sendo que 6 estão em perfeito equilíbrio ($r^2=1,0$) e 4 em alta correlação, variando de 96% a 100%. Em *OPG*, 2 SNV foram associados positivamente à periodontite. Essas variantes estão em alto desequilíbrio de ligação ($r^2=0.99$). Foi demonstrado, no gene *RANK*, 1f (rs4941125), 2b (rs55850220) e 3a (rs34432351, rs72931591) e no gene *RANKL* 3a (rs115675044 e rs443188), que há possibilidade de envolvimento em regiões reguladoras e funcionais. **Conclusão:** Variantes nos *RANK*, *RANKL* e *OPG* se mostraram frequentes na população estudada e tiveram seus alelos mais frequentes associados a doenças em populações ancestrais; e 40 variantes delas estão associadas e positiva e negativamente à periodontite.

Palavras-chave: Variante de único nucleotídeo. *RANK*. *RANKL*. *OPG*. Periodontite.

OLIVEIRA, Francine Vilma. **Influence of genetic variants on *RANK*, *RANKL* and *OPG* genes in periodontitis**. 2021. Advisor: Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz Carletto. 90 s. ill. Dissertation (Master in Interactive Processes of Organs and Systems) – Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2022.

ABSTRACT

Introduction: Periodontitis is a multifactorial inflammatory disease that affects the supporting tissues of the tooth, which can lead to tooth loss. The interaction of specific bacterial complexes involved in periodontitis, risk factors that interfere with the immune response of the host, including, for example, the cellular regulation of fibroblasts, osteoblasts and osteoclasts, and genetic susceptibility and specific variants, may be associated with the disease and to the difficulty of treatment. The *RANKL/RANK/OPG* system is involved in osteoclast differentiation and activation, regulating cellular responses and bone resorption in periodontitis. Genetic variants can influence the expression of these genes, which have been associated with diseases, in different populations. **Objectives:** Describe the frequency and regulatory potential of *RANK*, *RANKL* and *OPG* system variants; assess their potential as ancestry informative genetic markers (AIM); to evaluate the association of genetic variants in *RANK*, *RANKL* and *OPG* with the presence of periodontitis. **Methodology:** Cross-sectional study with 506 adult individuals participating in a cohort, affected by asthma and periodontitis. The genomic DNA was extracted and genotyped using the Illumina Multi-Ethnic Global Array (MEGA, Illumina) platform. The NCBI, Regulome DB, Haploview 4.2 and rSNPBase platforms were consulted and used. For association analyses, they were classified as having the presence (n=117) or absence (n=389) of periodontitis; and statistical analysis was performed using the PLINK 1.9 software, using logistic regression adjusted for age, obesity, mouth breathing habit, flossing, asthma and main component of ancestry. **Results:** The most frequent variants in the population studied were: rs4941129 in *RANK*, lowest allele frequency (MAF) 50%; the rs9525641 in *RANKL*, MAF 46% and the rs3102724 in *OPG*, MAF 46%. The rs 17069898 (1f) in *RANK*, rs2200287 (1d) in *RANKL* and rs3134063 (1f) in *OPG* had greater functional impact. In *OPG* and *RANK*, nine polymorphisms were characterized as AIM, predominantly YRI (African) and CEU (European) populations. They were associated with periodontitis in the *RANK* 27 SNV gene (single nucleotide variant), 20 of which were positively (odds ratio >1) and 16 of them showed high correlation with each other, ranging from 81% to 100%; and 7 negatively (odds ratio <1) and 2 of them with high correlation (96%), while 2 in perfect balance ($r^2=1.0$). In *RANKL*, 11 SNV were positively associated with periodontitis, with 6 being in perfect balance ($r^2=1.0$) and 4 in high correlation, ranging from 96% to 100%. In *OPG*, 2 SNV were positively associated with periodontitis. These variants are in high linkage disequilibrium ($r^2=0.99$). In the *RANK* gene 1f (rs4941125), 2b (rs55850220) and 3a (rs34432351, rs72931591 and in the *RANKL* 3a gene (rs115675044 and rs443188) there is a possibility of involvement in regulatory and functional regions. **Conclusion:** Variants of the *RANK*, *RANKL* and *OPG* genes were frequent in the population studied and had their most frequent alleles associated with diseases in ancestral populations; and 40 variants are positively and negatively associated with periodontitis.

Keywords: Single Nucleotide Variant. *RANK*. *RANKL*. *OPG*. Periodontitis.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1 - Desequilíbrio de ligação em pares nos genes *RANK(A)*, *RANKL(B)* e *OPG(C)*. Haploview utilizando o r^2 onde a intensidade da cor dos quadrados e o valor mostram a força dos valores de r^2 em uma escala em que quadrados sólidos em preto ($r^2 \geq 0,8$) expressam alta correlação, em tons de cinza expressam correlação intermediária e em branco mostram baixa correlação.....40

ARTIGO 2

Figura 1 - Análise do desequilíbrio de ligação (DL) realizada no programa Haploview usando o R^2 para os SNV associados no gene *RANK*. A intensidade da cor e o valor no quadrado indicam o grau de confiança no valor de R^2 e o quanto os SNV estão em desequilíbrio de ligação.....62

Figura 2 - Análise do desequilíbrio de ligação (DL) realizada no programa Haploview usando o R^2 para os SNV associados no gene *RANKL*. A intensidade da cor e o valor no quadrado indicam o grau de confiança no valor de R^2 e o quanto os SNV estão em desequilíbrio de ligação.....66

Figura 3 - Análise do desequilíbrio de ligação (DL) realizada no programa Haploview usando o R^2 para os SNVs associados no gene *OPG*. A intensidade da cor e o valor no quadrado indicam o grau de confiança no valor de R^2 e o quanto os SNV estão em desequilíbrio de ligação.....68

Figura 4 - Análise *in silico* da expressão dos SNV de *RANK* no sangue total, em alguns tipos de tecidos com fibroblastos e em células osteoblásticas primárias realizada no programa HaploReg 4.1.....68

Figura 5 - Análise *in silico* da expressão dos SNV de *RANKL* no sangue total, em alguns tipos de tecidos com fibroblastos e em células osteoblásticas primárias realizadas no programa HaploReg 4.1.....69

Figura 6 - Análise *in silico* da expressão dos SNV de *OPG* no sangue total, em alguns tipos de tecidos com fibroblastos e em células osteoblásticas primárias realizada no programa HaploReg 4.1.....70

Figura 7 - Análise da rede de interação funcional de proteínas codificadas pelos genes candidatos *RANK*, *RANKL* e *OPG* à periodontite, usando STRING v10.0, considerando cada proteína como um nó. Cor do nó: nós coloridos- proteínas de consulta e primeira camada de interatores. Conteúdo do nó: nós preenchidos- alguma estrutura 3D é conhecida ou prevista. A cor da linha indica o tipo de evidência de interação entre os genes- interações conhecidas: azul- interações de bancos de dados com curadoria; roxo- interações determinadas experimentalmente; verde claro- mineração de texto.....72

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Descrição dos polimorfismos em <i>RANK</i> na população estudada.....	36
Tabela 2 - Descrição dos polimorfismos em <i>RANKL</i> na população estudada.....	38
Tabela 3 - Descrição dos polimorfismos em <i>OPG</i> na população estudada.....	39
Tabela 4 - Diferencial de frequências alélicas entre três populações diferentes do Projeto 1000 Genomas para os marcadores genéticos do banco de dados do estudo.....	42
Tabela 5 - Descrição dos polimorfismos em <i>RANK</i> e <i>OPG</i> com AIM maiores que 30%. Cromossomo, gene, polimorfismo, pares de base, alelos, frequência de menor alelo (MAF) e função.....	45
Tabela 6 - Função dos SNP em <i>RANK</i> e <i>OPG</i> a partir de análises <i>in silico</i> , utilizando rSNPBase e RegulomeDB.....	46

ARTIGO 2

Tabela 1 - Frequências absolutas e relativas das características da amostra utilizadas como covariáveis neste estudo para periodontite (n=506).....	53
Tabela 2 - Comorbidades para doença periodontal presentes na amostra (n = 506).....	54
Tabela 3 - Histórico odontológico dos indivíduos presentes na amostra (n = 506).....	54
Tabela 4 - Descrição genética e funcional dos SNV em <i>RANK</i>	57
Tabela 5 - Associação significativa entre variantes no gene <i>RANK</i> e negativa à periodontite por regressão logística ajustado por idade, obesidade, hábito de respirar pela boca, uso de fio dental (pelo menos uma vez ao dia), asma e componente principal de ancestralidade da amostra.....	58
Tabela 6 - Associação significativa entre variantes no gene <i>RANK</i> e positiva à periodontite por regressão logística ajustado por idade, obesidade, hábito de respirar pela boca, uso de fio dental (pelo menos uma vez ao dia), asma e componente principal de ancestralidade da amostra.....	59
Tabela 7 - Descrição genética e funcional dos SNV em <i>RANKL</i>	63
Tabela 8 - Associação significativa entre variantes no gene <i>RANKL</i> e positiva à periodontite por regressão logística ajustado por idade, obesidade, hábito de respirar pela boca, uso de fio dental (pelo menos uma vez ao dia), asma e componente principal de ancestralidade da amostra.....	64

Tabela 9 - Descrição genética e funcional dos SNV em *OPG*.....67

Tabela 10 - Associação significativa entre variantes no gene *OPG* e positiva à periodontite por regressão logística ajustado por idade, obesidade, hábito de respirar pela boca, uso de fio dental (pelo menos uma vez ao dia), asma e componente principal de ancestralidade da amostra.....67

LISTA DE ABREVIATURAS, NOTAÇÕES E SIGLAS

A1	Alelo 1
A2	Alelo 2
ADD	Modelo aditivo
AIM	Marcador informativo de ancestralidade
CATK	Catepsina K
CEU	Origem do norte e oeste da Europa
CHB	Indivíduos han de Pequim, China
CHR	Cromossomo
CSF-1	Fator de crescimento do polipeptídeo
DL	Desequilíbrio de Ligação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOM	Modelo dominante
FGF23	Fibroblastos-23
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de Confiança
IgE	Imunoglobulina E
IGF-I	Fator de crescimento I semelhante à insulina
IGSR	International Genome Sample Resource
IL-1	Interleucina 1
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de massa corporal
LPS	Lipopolissacarídeo
MAF	Frequência do menor alelo
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MMP-8	Metaloproteinase-8

MMP-9	Metaloproteinase-9
MMPs	Metaloproteinases da matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NFATc1	Fator nuclear das células T ativadas
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
OPG	Osteoprotegerina
OR	Odds Ratio
PAD	Peptil arginina deiminase
pQCT	tomografia computadorizada quantitativa periférica
PTH	Paratireoide
RANK	Receptor ativador do NF- κ B
RANKL	Ligante do receptor-ativador do NF- κ B
REC	Modelo recessivo
SDF-1	Fator derivado do estroma
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SNV	Variante de nucleotídeo único
T ⁺ CD4	Linfócitos T CD4
TGF β	Fator de crescimento transformador
TH1	Linfócitos T Helper 1
TH17	Linfócitos T Helper 17
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFRSF11A	Membro 11A da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral
TNFRSF11B	Membro 11B da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral
TNFSF-1	Membro da superfamília TNF
TNFSF11	Membro 11 da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
YRI	Indivíduos iorubás de Ibadan, Nigéria

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
3.1. OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 REVISÃO DA LITERATURA	20
4.1 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL	20
4.2 METABOLISMO DO TECIDO ÓSSEO.....	22
4.3 O SISTEMA <i>RANK</i> , <i>RANKL</i> E <i>OPG</i> NOS TECIDOS PERIODONTAIS.....	25
4.4 FATORES DE RISCO PARA A PERIODONTITE.....	26
4.5 GENES <i>RANK</i> , <i>RANKL</i> , <i>OPG</i> E VARIANTES GENÉTICAS	28
5 MATERIAIS E MÉTODO	31
6 RESULTADOS	32
6.1 ARTIGO 1: CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES <i>OPG</i> , <i>RANK</i> E <i>RANKL</i> EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA	32
6.2 ARTIGO 2: INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES <i>RANK</i> , <i>RANKL</i> e <i>OPG</i> NA PERIODONTITE	48
7 DISCUSSÃO GERAL	77
8 CONCLUSÃO GERAL	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	88
ANEXO - TERMO DE APROVAÇÃO NO CONSELHO DE ÉTICA EM PESQUISA	90

1 INTRODUÇÃO

A periodontite compreende uma condição inflamatória, iniciada por interações complexas entre microrganismos patogênicos - presentes na microbiota oral - e a resposta imunológica do hospedeiro. Com a evolução dessa doença, as estruturas de suporte dos dentes, que são a gengiva, o ligamento periodontal e o osso alveolar, ficam comprometidos, o que pode culminar com a perda dental. Os osteoclastos são as principais células envolvidas na reabsorção óssea, a qual acontece na periodontite em resposta a diversas citocinas, quimiocinas, fatores de transcrição e moléculas coestimuladoras produzidas e liberadas durante a inflamação. (1, 2)

No processo da osteoclastogênese, ocorre a estimulação de progenitores de osteoclastos mononucleares, pelo Fator de Estimulação de Colônias de Macrófagos (M-CSF), e a ativação do Fator Nuclear- κ B (NF- κ B), por RANKL (Ligante do receptor-ativador do NF- κ B). RANKL liga-se ao RANK (receptor-ativador do NF- κ B), induzindo a diferenciação dos pré-osteoclastos em osteoclastos maduros, que são os que reabsorvem a matriz óssea. Já a osteoprotegerina (OPG) previne a ligação RANK-RANKL por inibição competitiva. O aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias, que ocorre na periodontite, pode elevar os níveis de RANKL e ativar os osteoclastos, bem como inibir a atividade de OPG (3).

Além da periodontite, o sistema RANK/RANKL/OPG está associado a várias doenças inflamatórias e ósseas, a exemplo da osteoporose, artrite reumatoide e tumores, como o câncer de mama (4, 5, 6), bem como se relaciona à densidade mineral óssea (7, 8). Uma conjunção de fatores ambientais e genéticos está relacionada com a doença periodontal. A identificação dos fatores genéticos e o estudo de genes *RANK*, *RANKL* e *OPG*, relacionados com o metabolismo ósseo, podem ser determinantes para o conhecimento do risco clínico significativo de cada paciente. Esses genes, localizados nos cromossomos 18 (*RANK*), 13 (*RANKL*) e 8 (*OPG*) podem ter sua expressão alterada por variações genéticas de nucleotídeo único (SNV), o que pode resultar numa maior susceptibilidade ou proteção para o desenvolvimento de uma doença. Inúmeros estudos mostram a influência destes SNV em *RANK*, *RANKL* e *OPG* na patogênese dessas doenças ósseo-inflamatórias (7,9,10).

Estas variações genéticas podem ser mais prevalentes em um determinado grupo racial ou étnico do que no resto da população. Variantes relacionadas à hipertensão, diabetes *mellitus* tipo 2, doença renal e câncer de próstata, por exemplo, mostraram diferenças significativas entre os grupos étnicos (11). Assim, ao analisar variantes genéticas nesses genes, numa população do

Nordeste brasileiro, tornou-se relevante pesquisar se essas variantes se comportam como marcadores de ancestralidade, visto que essa população tem miscigenação de americanos, europeus e africanos, com predomínio dos últimos (12,13).

A identificação dos fatores genéticos para a periodontite e o estudo de genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* relacionados com o metabolismo ósseo podem ser determinantes para o conhecimento do risco clínico significativo de cada paciente. Sendo assim, tem havido grande interesse na identificação de variantes genéticas que podem ser usadas para avaliar o risco e/ou gravidade da periodontite (14,15). Dessa forma, entender acerca da frequência de SNV de genes relacionados a doenças inflamatórias, como a periodontite, em nossa população, bem como desvendar o caráter de componentes genéticos, podem explicar a diversidade de fenótipos clínicos entre grupos populacionais, bem como susceptibilidade à doença. Isso permitirá direcionar novas estratégias para o tratamento da periodontite, com base em informações genéticas.

2 JUSTIFICATIVA

A periodontite é a principal causa de perda dental em adultos e está associada a um grave impacto na qualidade de vida e na autoestima dos indivíduos, a dispendiosos gastos com tratamentos e a reabilitações protéticas. Além disso, um conjunto de evidências vincula essa doença a um risco aumentado de doenças sistêmicas, como diabetes e problemas cardiovasculares. Variantes genéticas nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG*, relacionados com o metabolismo ósseo, podem estar associadas à suscetibilidade e gravidade da periodontite. A falta de resposta aos tratamentos convencionais pode estar relacionada à interação de fatores ambientais e genéticos, criando um fenótipo que dificulta o sucesso na prevenção e tratamento. Sendo assim, o entendimento do conjunto desses fatores pode ser determinante para o diagnóstico, prognóstico e a descoberta de novas estratégias seguras e eficazes na conduta terapêutica adequada ao tratamento da periodontite.

Ao considerarmos que a população brasileira apresenta grande miscigenação racial, acreditamos ser relevante descrever as variantes genéticas em *RANK*, *RANKL* e *OPG* em uma população de Salvador (BA), em comparação com suas populações ancestrais, bem como fazer um levantamento de quais doenças já foram descritas anteriormente, associadas a essas variantes, em outras populações.

Em um futuro próximo, exames de rastreamento genético podem identificar indivíduos que tenham variantes genéticas que podem predispor ao ou proteger o desenvolvimento da doença, permitindo que melhores estratégias de tratamento e prevenção sejam implementadas.

3 OBJETIVOS

Apresentam-se, a seguir, os objetivos a serem alcançados com o desenvolvimento deste estudo.

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar as variantes dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* e investigar a sua associação à periodontite em uma população brasileira.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever as frequências das variantes genéticas em *RANK*, *RANKL* e *OPG* em indivíduos da população estudada;

Avaliar o potencial das variantes genéticas em *RANK*, *RANKL* e *OPG* como marcadores genéticos informativos de ancestralidade;

Avaliar o impacto funcional *in silico* das variantes genéticas estudadas em *RANK*, *RANKL* e *OPG*;

Investigar a associação entre variantes genéticas nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* e a periodontite;

Avaliar o impacto funcional *in silico* das variantes genéticas estudadas em *RANK*, *RANKL* e *OPG* no estudo de associação com a periodontite.

4 REVISÃO DA LITERATURA

Esta seção compreende o referencial teórico levantado para dar cobertura ao tema objeto deste estudo

4.1 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal é uma condição inflamatória que afeta os tecidos de suporte dos dentes (osso alveolar, ligamento periodontal, cemento radicular e gengiva), podendo resultar na sua perda e até mesmo ocasionar uma condição inflamatória sistêmica. O início e o desenvolvimento da doença periodontal dependem da interação entre um biofilme dental disbiótico e as respostas imunológicas do hospedeiro (16).

Diversos patógenos estão envolvidos na composição do biofilme dental associado à periodontite (17). Esses patógenos vivem em complexos dentro da placa dental e estão divididos em grupos de acordo com os que estavam fortemente relacionados entre si: complexo vermelho, que inclui as bactérias *P. gingivalis*, *B. forsythus* e *T. denticola*; complexo laranja, composto pela bactérias *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *E. nodatus* e *S. constellatus*; complexo verde, composto pelos microrganismos da espécie *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; já *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus oralis* fazem parte do complexo amarelo e, por fim, o complexo roxo é formado por *Actinomyces odontolyticus* e *Veilonella parvula*. Além da interação entre as bactérias de um mesmo complexo, eles estão relacionados entre si, como, por exemplo, o complexo vermelho está fortemente relacionado com o laranja. As bactérias do complexo vermelho estão fortemente relacionadas com uma maior profundidade da bolsa periodontal e maior sangramento à sondagem (18). A presença de *Porphyromonas endodontalis*/ *Porphyromonas* spp e *Tannerella forsythia* na bolsa periodontal é considerada fator de risco para a doença periodontal. Índices elevados de *Porphyromonas gingivalis* podem ser indicativos de progressão da periodontite (19). Já os microrganismos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Peptostreptococcaceae* sp. e *P. alatolyticus* foram associados a periodontite agressiva (20).

Em estado de saúde, o ambiente oral tem uma infinidade de bactérias e vírus que compõem o ecossistema oral e que convivem numa relação de simbiose entre as várias espécies do biofilme dental e entre estas e a defesa do hospedeiro. Ainda há um conhecimento limitado acerca dos fatores que mantêm esse equilíbrio e do papel das bactérias comensais para evitar a disbiose, que leva ao desenvolvimento da doença (21). A mudança do estado saudável para a disbiose parece ser conduzida pelos principais agentes microbianos da comunidade. Os principais patógenos ativos nas comunidades disbióticas são os patógenos do complexo vermelho, por exemplo, *Porphyromonas gingivalis*, a qual apresenta diversos fatores de virulência, como a enzima *PAD* (peptil arginina deiminase), considerada causadora da forte resposta autoimune na periodontite (22).

Os patógenos secretam enzimas e metabólitos que desencadeiam o início do processo inflamatório, causando disfunção e lesão tecidual que causam a gengivite, caracterizada por sangramento, hiperemia e edema. Quando não tratada, a gengivite pode evoluir e ser um estágio que precederá a periodontite (17).

A resposta inflamatória do hospedeiro frente à agressão dos antígenos bacterianos envolve uma resposta imune inata e adaptativa e ocorre no sentido de defender o organismo de microrganismos invasores, remover substâncias irritantes e está relacionada com o reparo tecidual. Nesse sentido, há o envolvimento de uma complexa cascata de mediadores inflamatórios e células; essa resposta geralmente tem início com a vasodilatação, seguida da ativação celular e o aumento da permeabilidade dos vasos. Vários agentes podem promover a vasodilatação: os macrófagos infiltrados no tecido inflamado, secretando óxido nítrico; os fibroblastos do tecido gengival; e principalmente os mastócitos secretando histamina (16, 17).

Na lesão inicial da doença periodontal, o epitélio juncional do sulco gengival mostra poucos neutrófilos, macrófagos e células T primárias. A conversão do epitélio juncional em epitélio da bolsa periodontal acontece em menor grau (23). A gengivite apresenta uma disbiose incipiente, onde o biofilme já se apresenta mais espesso e os seus antígenos vão apresentar os fatores de virulência, como o *LPS* (lipopolissacarídeo das bactérias *Gram -*). Nesse contexto há uma resposta proporcional do hospedeiro, com a manifestação de anticorpos, polimorfonucleares, células B e T (21). Inicialmente, as células T predominam no infiltrado e eventualmente as células B entram em ação, à medida que a lesão progride. A conversão em epitélio da bolsa progride, tanto no epitélio juncional, quanto no epitélio sulcular (23).

Quando não há tratamento e remoção desse biofilme, a inflamação persiste na tentativa de eliminar, geralmente sem sucesso, os agentes patogênicos e fazer o reparo tecidual, com a conjugação de fatores ambientais e genéticos que modulam o processo patogênico. Inicia-se a perda óssea alveolar, levando à progressão da doença periodontal. Nessa etapa, há uma franca disbiose, com um biofilme bastante patogênico e uma resposta desproporcional do hospedeiro com grande inflamação (21). Os neutrófilos estão presentes em grande quantidade, tanto no sulco gengival, quanto no epitélio juncional. Há ulceração do epitélio da bolsa e degradação óssea (23). Nessa resposta inflamatória, há liberação de citocinas, prostaglandinas e metaloproteinases da matriz (MMP) (21). As metaloproteinases recrutam ainda mais células inflamatórias para o local da inflamação. Os neutrófilos estimulados são as principais células do sistema imunológico que combatem agentes patogênicos e regulam positivamente a expressão de várias proteinases e enzimas oxidativas, as quais podem degradar componentes da matriz extracelular como *MMP-8*, *MMP-9* e elastase de neutrófilos (24). Sendo assim, pode-se observar na periodontite: vermelhidão, textura alterada e inchaço da gengiva marginal, sangramento à sondagem, maior profundidade à sondagem, destruição das estruturas de suporte dos dentes (ligamento e osso alveolar), recessão da gengiva marginal (que expõe a raiz), aumento da mobilidade e, eventualmente, perda dentária. A dor geralmente se manifesta com exacerbações agudas devido ao aparecimento de abscessos ou devido à má oclusão causada pelo desalinhamento dos dentes que estão com o suporte debilitado. Porém, a doença periodontal típica é indolor e geralmente os indivíduos só procuram tratamento nos estágios mais avançados (16).

4.2 METABOLISMO DO TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido dinâmico que sofre constante remodelação devido à ação de células produtoras de osso, os osteoblastos, e de células que reabsorvem a matriz óssea, os osteoclastos (25, 26). Essa remodelação óssea fisiológica ocorre em resposta às mudanças nos níveis de eletrólitos ou forças mecânicas no osso (26), contudo, um desequilíbrio entre reabsorção e deposição óssea pode resultar em diversas condições patológicas, como a osteoporose (26, 27) e a osteopetrose, respectivamente (26), além de outras, como a artrite reumatoide (28).

A homeostase do fósforo corporal é controlada por um balanço hormonal entre intestino, osso e rim. Os principais hormônios envolvidos nesse processo são o hormônio da paratireoide (PTH), 1,25-di-hidroxivitamina-D e o fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF23). São os

osteócitos que produzem o FGF23, sendo este hormônio essencial no processo de remodelação óssea. Sua produção é regulada por fatores locais e sistêmicos. São fatores locais os níveis extracelulares de fosfato inorgânico e pirofosfato e a proteína derivada de osteócitos, a esclerostina. Também a 1,25-di-hidroxitamina-D, sintetizada localmente pelas células ósseas, pode contribuir para a regulação da produção de FGF23. As funções endócrinas de PTH e 1,25-di-hidroxitamina-D exercem o controle sistêmico. Numa situação de equilíbrio do organismo, a esclerostina, por sinalização para-autócrina, regula positivamente a produção de FGF23 pelo osteócito (29).

As células precursoras dos osteoblastos proliferam em resposta a citocinas, como o fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-I) e o fator de crescimento transformador (TGF β). E a diferenciação dos osteoblastos é estimulada por citocinas osteogênicas, como a proteína morfogenética óssea (BMP) e a via de sinalização Wnt, bem como é controlada por fatores de transcrição relacionados ao Runt (Runx) 2 e Osterix. Essa diferenciação é inibida pelos antagonistas Wnt Frizzled e esclerostina. Osteoblastos maduros ficam embutidos na matriz óssea e se transformam em osteócitos; estes osteócitos agem orquestrando osteoclastos e osteoblastos e respondem à estímulos como os do hormônio da paratireoide (PTH). A esclerostina e o RANKL estão entre os reguladores mais importantes produzidos pelos osteócitos (28, 30, 31, 32).

O osteoclasto se origina da diferenciação de células precursoras de monócitos/macrófagos na superfície óssea ou nas suas proximidades (28). Dois fatores hematopoiéticos estimulam a osteoclastogênese: a citocina relacionada ao TNF (fator de necrose tumoral) RANKL e o fator de crescimento do polipeptídeo CSF-1. Posteriormente, ocorre ativação do RANK na superfície das células precursoras hematopoiéticas. Assim, CSF-1 e RANKL são necessários para induzir a expressão de genes que tipificam a linhagem osteoclástica, incluindo os que codificam fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), catepsina K (CATK), receptor de calcitonina e β 3-integrina⁷, levando ao desenvolvimento de osteoclastos maduros (33).

Na presença de uma inflamação crônica ou aguda, ocorre um desequilíbrio entre produção e reabsorção de osso (26), que é promovido pelo eixo do RANKL/RANK/OPG, o qual regula a diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos (26, 34). A liberação dos mediadores inflamatórios induz a ativação dos osteoblastos, levando à produção do RANKL, diminuindo a produção de OPG e ativando os osteoclastos, através do aumento de fatores

osteoclastogênicos, como o NFATc1 (fator nuclear das células T ativadas) e TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato), o que leva à perda óssea (35).

OPG é uma proteína solúvel, membro da família TNF, codificado pelo gene *TNFRSF11B*, secretado por células de linhagem osteoblástica (28, 32), células mesenquimais e células B, que age como um chamariz para RANKL através de seus quatro domínios ricos em cisteína (4), desempenhando, assim, a função de um inibidor de RANK. Assim, a concentração relativa de RANKL e OPG no osso é um dos principais determinantes de massa e de força óssea (34).

O receptor para RANKL é RANK, codificado pelo gene *TNFRSF11A*, uma proteína transmembrana do tipo I, expressa por uma linhagem de células osteoclásticas e por células dendríticas (28, 32).

A citocina RANKL, também conhecida como fator de diferenciação dos osteoclastos, ODF, TRANCE e TNFSF-1, tem papel importante na diferenciação de linfócitos, produção de células do intestino, termorregulação em mulheres e desenvolvimento de glândulas mamárias (28). Trata-se de uma proteína transmembrana do tipo II, expressa em osteoblastos, condrócitos hipertróficos, células T ativadas e células mesenquimais. Quando o RANKL se liga ao seu receptor, RANK, nas superfícies celulares dos osteoclastos e pré-osteoclastos, promove a formação de osteoclastos, estimulando a proliferação e diferenciação (36).

Mutações no *TNFRSF11A*, *TNFSF11* e *TNFRSF11B* foram identificadas em indivíduos com doenças como osteólise expansiva familiar, osteopetrose autossômica recessiva e doença de Paget juvenil, respectivamente. Outras doenças associadas ao eixo *RANK-RANKL-OPG* são espondilite anquilosante, fibrodissplasia ossificante progressiva e doença inflamatória intestinal (28).

A interação RANK-RANKL-OPG também está associada à diabetes, onde há redução das células β pancreáticas, e sabe-se que a osteoprotegerina é capaz de estimular a replicação de células β humanas adultas ao impedir a ligação de RANK-RANKL. Assim, medicamentos usados para a osteoporose atuam como anticorpo específico para RANKL e acabam estimulando a produção de células β pancreáticas (37).

RANKL tem um papel numa série de doenças, como na artrite reumatoide, doença autoimune onde há a inflamação do líquido sinovial que reveste a articulação e que, ao longo do tempo, promove danos ósseos. Nessa doença, RANKL é expresso principalmente por

fibroblastos sinoviais e células T nas articulações de indivíduos com esse distúrbio. Mas é a sua expressão em fibroblastos sinoviais e não em células T que é predominantemente responsável pela formação de osteoclastos e erosões durante a artrite inflamatória (38). As células B de memória também podem produzir RANKL e aumentar a atividade de osteoclastos reabsorventes, levando à reabsorção óssea na artrite reumatoide (39).

Outra doença que apresenta perda óssea por uma condição inflamatória é a periodontite, onde os tecidos de suporte do dente são afetados e a perda óssea alveolar leva, em muitos casos, à perda dental. A penetração de bactérias através do epitélio oral desperta a resposta imune do periodonto, com a ativação de células, como a TH17, que produzem IL-17, estimulando osteoblastos e células do ligamento periodontal a expressarem RANKL, bem como outras citocinas inflamatórias, estimulando consequentemente os osteoclastos a reabsorverem osso (4).

4.3 O SISTEMA RANK, RANKL E OPG NOS TECIDOS PERIODONTAIS

A destruição óssea na doença periodontal é mediada pela resposta imune e inflamatória do hospedeiro aos patógenos periodontais. O infiltrado inflamatório nos tecidos moles gengivais e no periodonto produz uma série de citocinas que ativam os osteoclastos, células centrais da reabsorção óssea (36).

As células residentes do tecido periodontal, incluindo células epiteliais, fibroblastos gengivais, fibroblastos do ligamento periodontal, osteoblastos e células dendríticas, respondem pela imunidade inata do hospedeiro. Essas células respondem à ação dos patógenos periodontais através dos receptores *toll like*, produzindo citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. As células epiteliais produzem a IL-8, um quimioatraente para neutrófilos, que aumenta a adesão de monócitos. Os neutrófilos produzem IL-1, IL-6 e TNF- α , já os monócitos podem se diferenciar em osteoclastos. As células dendríticas produzem IL-12 e IL-18 e atuam como células apresentadoras de antígeno para as células B e T. Os fibroblastos gengivais produzem IL-8, TNF- α , IL-6, proteína inflamatória de macrófagos (MIP) -1 alfa e fator derivado do estroma (SDF) -1, importantes reguladores do processo inflamatório e do metabolismo ósseo. Os fibroblastos do ligamento periodontal expressam *MMPs* e produzem IL-1 β , IL-6, TNF- α e RANKL. Os microrganismos também podem se aprofundar no tecido periodontal e atingir a superfície do osso alveolar, promovendo a expressão da citocina pró-osteoclastogênica RANKL pelos osteoblastos (40).

Posteriormente à essa resposta inicial, que dura em torno de 21 dias, inicia-se a resposta inune adaptativa, onde as células apresentadoras de antígeno ativam as células B e T. A maioria das células B nas lesões periodontais expressam RANKL. As células T CD4 produzem as citocinas pró-osteoclastogênicas RANKL e TNF- α e IL-17, que exercem sua atividade osteoclastogênica, melhorando a expressão de RANKL nos osteoblastos. Assim, a principal fonte primária de RANKL na doença periodontal são as células TH1 ou TH17, bem como as células B, enquanto as células Treg atenuam a expressão de RANKL por outras células T ativadas (41).

Nessa fase ativa da doença periodontal, há um desequilíbrio entre a proporção de RANKL e OPG, com elevada expressão de RANKL comparada com o OPG, fazendo com que RANKL fique disponível para a ligação com RANK. Assim, indivíduos com periodontite, agressiva ou crônica, apresentam valores mais elevados de RANKL/RANK em relação a OPG, devido à inflamação local e à perda óssea (42,43,44,45).

A expressão de RANKL é maior em um estágio avançado de periodontite, em comparação à gengivite, demonstrando que RANKL desempenha um papel importante na reabsorção óssea alveolar (46).

O eixo RANK/RANKL/OPG é o centro da regulação do metabolismo ósseo e é um alvo farmacológico atraente para o tratamento da perda óssea patológica. O uso de inibidores de RANKL na periodontite, testado em modelos animais, demonstra um efeito protetor na reabsorção óssea alveolar (45).

4.4 FATORES DE RISCO PARA A PERIODONTITE

A presença de diferentes fatores combinados pode determinar, em indivíduos distintos, processos relacionados ao início, progressão e gravidade da DP. Esses fatores podem estar agrupados em: herdados geneticamente; adquiridos, onde se incluem os fatores sociais, educacionais e econômicos; e o ambiente, que pode ser influenciado pela microbiota oral e quantidade e qualidade do biofilme; além disso, algumas doenças como diabetes *mellitus*, obesidade e asma; ademais do estilo de vida dos indivíduos, como tabagismo, hábitos de higiene oral e de respirar pela boca, e a dieta (47,48,49).

Segundo a classificação de periodontite, constante no Consensus report: Chronic periodontitis, de 1999 (50), a periodontite crônica é mais prevalente em adultos (16,51) embora

a periodontite agressiva possa acontecer em crianças (16). O agravamento da periodontite com o avanço da idade está relacionado a diversos fatores. Muitas doenças sistêmicas são fatores de risco para a periodontite, como mencionado anteriormente. E essas doenças têm sua prevalência aumentada com a idade. A resposta imunológica dos idosos também tende a ficar debilitada, assim como podem surgir deficiências físicas e cognitivas que impedem uma correta higiene bucal. Por fim, fatores socioeconômicos também podem impedir o acesso dos idosos ao tratamento odontológico (52).

Com relação ao gênero, não há um consenso na literatura sobre a prevalência do gênero feminino ou masculino em relação à periodontite (53) e tampouco em relação ao sexo como fator de risco. Os homens parecem ter maior risco da doença periodontal destrutiva do que as mulheres, porém não há uma evolução mais rápida no gênero masculino do que no feminino (54). Em estudo retrospectivo que avaliou a eficácia do tratamento com laserterapia guiada pelo perfil microbiano das bolsas periodontais, em 2683 indivíduos, não foi observada diferença entre gêneros (55).

A composição genética específica e os níveis circulantes de hormônios sexuais, somados à diferença na resposta do sistema imunológico, pode ser uma explicação ao fato de os homens terem maior risco à periodontite crônica. Porém, com o passar da idade e a redução dos hormônios sexuais, principalmente o estrogênio, as mulheres podem apresentar maior susceptibilidade à periodontite e à perda óssea (56, 57).

A educação em saúde bucal também influencia na higiene e, conseqüentemente, na doença periodontal (49). Níveis socioeconômicos mais baixos relatam sinais mais avançados da doença periodontal e sua maior prevalência (51,58). Há um estudo mostrando que em pessoas que passaram dos 40 anos, sem cuidados com a saúde bucal, houve significativo aumento da perda dentária relacionada com a periodontite com o aumento da idade, o que levou à conclusão da importância de se tratá-la precocemente e cessar o tabagismo (59).

As desigualdades socioeconômicas influenciam no desenvolvimento da doença periodontal, a qual acaba sendo mais severa em homens, que não tiveram acesso a uma educação de qualidade, fumantes ou ex-fumantes, que costumam visitar o dentista somente uma vez ao ano ou que não contam com plano de saúde odontológico (49,60).

Além dos fumantes apresentarem maior susceptibilidade e gravidade na periodontite, mostram também uma progressão mais rápida, com maior perda de dentes e pior resposta ao

tratamento periodontal. O tabaco provoca efeitos oxidativos nos tecidos periodontais, provocando uma supressão do sistema imunológico, promovendo mudanças funcionais nas principais células imunes (61).

Assim como o tabaco, a obesidade também interfere com a resposta inflamatória do indivíduo, predispondo ao desenvolvimento da doença periodontal. Os adipócitos secretam citocinas pró-inflamatórias como *TNF- α* e *IL-6*, que estimulam a produção de proteína C reativa (PCR), alterando a resposta do hospedeiro e levando à maior susceptibilidade da infecção bacteriana (62,63).

Há também uma forte associação entre asma e doença periodontal (64), o que leva os indivíduos asmáticos a terem elevado risco de desenvolvê-la, principalmente aqueles com demandas de emergências médicas, internações e uso de corticoides inalatórios (65). A manifestação clínica da asma provoca diminuição do fluxo salivar, desidratação da mucosa alveolar devido à respiração bucal, alteração da resposta imunológica do paciente, com elevação de *IgE* no tecido gengival, aumentando a inflamação, determinado o aumento do cálculo dental devido ao aumento dos níveis de cálcio e fósforo na saliva e diminuição da densidade mineral óssea devido ao uso corticoides inalatórios. Tudo isso contribui para o desenvolvimento e agravamento da periodontite (64,65,66).

Outro fator que pode interferir na periodontite é a ancestralidade, que seria o fato de que certas variantes genéticas podem ser mais prevalentes em grupo racial/étnico do que no restante da população (11). Nos Estados Unidos, alguns estudos mostram chineses e negros com maior prevalência da periodontite do que brancos (67); outros encontraram maior prevalência entre hispânicos, e na sequência, em negros não-hispânicos, depois por asiáticos não-hispano-americanos e por brancos não-hispânicos (51).

4.5 GENES *RANK*, *RANKL*, *OPG* E VARIANTES GENÉTICAS

Variantes de nucleotídeo único, do inglês *Single Nucleotide Variant* (SNV), são as alterações genéticas encontradas com maior frequência entre os indivíduos (68), afetando mais que 1% da população (69). A função de uma proteína ou sua expressão pode ser modificada quando há uma alteração na sequência de codificação de um gene (SNV), levando à substituição de um aminoácido. Esse mecanismo resulta em alterações na imunidade inata e adaptativa (68,69). As diferenças individuais entre diversos fenótipos de uma mesma doença decorrem das

respectivas diferenças genéticas atribuídas a variantes genéticas que levam a níveis variados de expressão gênica entre os indivíduos (70).

Variantes genéticas nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* têm sido descritos para diversas doenças, em diferentes populações. A população brasileira apresenta grande miscigenação racial, sendo descendente de três grupos raciais principais: africanos, europeus e ameríndios (12), recebendo assim influência genética dessas populações, associada também aos polimorfismos.

A diversidade de fenótipos que uma doença pode apresentar também ocorre na periodontite, na qual a patogênese envolve uma complexa interação entre o desafio microbiano e a resposta imunológica do hospedeiro. A resposta imuno-inflamatória individual tem grande influência no desenvolvimento da doença e torna-se um gatilho no processo de remodelação óssea, característico da periodontite. O mecanismo de susceptibilidade individual com doença periodontal parece estar relacionado com variantes em genes que codificam proteínas relacionadas a receptores das membranas celulares do sistema imunológico, bem como a mediadores relacionados à reabsorção óssea (9).

Nesse contexto, diversos estudos têm mostrado a associação de variantes genéticas em *RANK*, *RANKL* e *OPG* com a periodontite. Tanto em fibroblastos gengivais humanos, como em células do ligamento periodontal humano, o calcitriol proveniente da vitamina D pode induzir significativamente a expressão de *mRNA* e da proteína de *RANKL*. Assim, a razão *RANKL/OPG* foi significativamente elevada sob estimulação do calcitriol, o que pode revelar uma maior suscetibilidade à periodontite (71).

Variantes em *RANKL* e *OPG* mostraram-se um risco para periodontite em homens, independentemente dos hábitos de fumar. Os autores não discutiram sobre possíveis fatores relacionados a essa diferença entre gênero, mas observaram que homens carregando o genótipo A/A em *RANKL* e o genótipo C/T em *OPG* apresentaram risco de 100 a 200% maior de desenvolver a periodontite, em comparação com mulheres portadoras dos mesmos genótipos. Notou-se que variantes genéticas que influenciam na resposta inata e no processo de reabsorção óssea foram fatores predisponentes à doença em homens, independentemente do uso do cigarro (9). Ainda quanto ao gene *RANKL*, outro estudo encontrou uma prevalência do genótipo CT do rs9533156 significativamente maior no grupo com periodontite crônica (10). E, em oposição, outra pesquisa em indivíduos diabéticos não encontrou associação entre periodontite e variantes genéticas no gene *OPG* (72). A incidência de variantes genéticas muda de acordo com a etnia

da população estudada, portanto, uma possível associação entre um variantes genéticas e doença para uma população pode não ser válida para outras. As discrepâncias entre os estudos podem ser explicadas também pela variação nos critérios de seleção de indivíduos com periodontite e controles. Além disso, há necessidade de estudos que englobem grandes amostras populacionais, para validar os efeitos das variantes com precisão no que diz respeito ao poder estatístico (73).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se um estudo transversal com 506 indivíduos (n=506), participantes de uma coorte, acometidos de asma e periodontite, moradores de Salvador, Bahia, Brasil. Inicialmente, 1179 indivíduos foram avaliados e tiveram o DNA genômico extraído e genotipado, utilizando-se a plataforma Illumina Multi-Ethnic Global Array (MEGA, Illumina). Foram excluídos parentes consanguíneos e incluídos no estudo indivíduos adultos (≥ 18 anos) de ambos os sexos. Procedeu-se a um controle de qualidade da amostra, avaliando as informações pessoais e dados das amostras dos participantes. Para as análises de associação das variantes dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* e periodontite, os indivíduos do estudo foram divididos em Grupo Caso, classificados com presença de periodontite (n=117), Grupo Controle, sem o diagnóstico de periodontite (n=389) (74). Realizou-se uma entrevista para obtenção de dados dos participantes relacionados às características socioeconômico-demográficas, hábitos e estilo de vida, história médica e odontológica e acesso aos cuidados de saúde bucal. Esta pesquisa segue os requisitos éticos e aprovada pela CONEP e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Comitê da Maternidade Climério de Oliveira, CAAE: 25000.013834/2010-96.

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO I:

CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *OPG*, *RANK* E *RANKL* EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Introdução

O tecido ósseo é metabolicamente ativo e o sistema RANKL (receptor-ativador do fator nuclear-ligante κ B) / RANK (receptor ativador do NF- κ B) / OPG (osteoprotegrina) regulam a reabsorção e a deposição óssea que ocorrem no processo de remodelação óssea. Esse sistema está envolvido no metabolismo ósseo e no sistema imunológico em processos fisiológicos e patológicos (4) (33). O RANKL está expresso em vários tipos de células, como fibroblastos, linfócitos B, linfócitos T (75), odontoblastos, ameloblastos (76), osteoblastos e osteócitos. Sendo assim, ele tem sido estudado em doenças como a osteoporose, artrite reumatoide e tumores, como o câncer de mama (4). O RANKL liga-se ao seu receptor RANK em macrófagos, precursores dos osteoclastos, resultando na diferenciação destes em osteoclastos diferenciados e ativos que secretam enzimas responsáveis pelo aumento da reabsorção óssea. A transformação de proteínas morfogênicas ósseas relacionadas ao fator de crescimento β é o que regula os níveis de OPG. Altas concentrações de OPG evitam a perda óssea, já que a ligação RANK-RANKL é impedida, pois *OPG* é um receptor solúvel de RANKL. Entretanto, na doença periodontal, por exemplo, um aumento de citocinas pró-inflamatórias no tecido periodontal, como IL-1 β e TNF, aumentam a quantidade de RANKL em relação à OPG, levando à perda óssea (77). RANKL, RANK e OPG pertencem à superfamília de citocinas TNF (25) (28).

O gene *RANKL* humano (símbolo do gene: *TNFSF11*) está localizado no cromossomo 13 (13q14.11) e codifica uma glicoproteína com 317 aminoácidos. O gene *RANK* humano (símbolo do gene: *TNFRSF11A*) está localizado no cromossomo 18 (18q21.33) e codifica um receptor com 616 aminoácidos. O gene *OPG* humano (símbolo do gene: *TNFRSF11B*) está localizado no cromossomo 8 (8q24.12) e codifica um receptor com 401 aminoácidos (4). Como a via de sinalização RANK/RANKL está ligada diretamente à formação e à função dos osteoclastos, mutações genéticas que resultem no aumento dessas células aumentarão a reabsorção óssea. Se o gene que codifica *OPG*, que é o receptor chamariz de RANK, sofrer exclusão ou mutações aumentará os sinais de RANK, sem alterar os níveis de RANKL. Já duplicações no primeiro éxon do *RANK*, que resultem na presença de mais 5, 6 ou 9

aminoácidos no peptídeo sinal, levam à retenção do receptor não processado na célula, ao invés da sua inserção na membrana plasmática. Vários mecanismos acabam ativando automaticamente esse receptor interno, produzindo sinais que levam à geração de maior número de osteoclastos ativos (78).

A expressão de *RANKL*, *RANK* e *OPG* em diversas células já foi amplamente descrita na literatura. Polimorfismos genéticos nesses genes podem estar relacionados com diversas patologias, como a periodontite, a osteoporose e a artrite reumatoide. A variação da sequência de nucleotídeos em um alelo de um gene é conhecida como polimorfismo, sendo os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) os tipos mais frequentes de alterações genéticas entre os indivíduos. A função de uma proteína pode ser alterada por um SNP, resultando numa susceptibilidade para o desenvolvimento do fenótipo para determinada doença (68). Polimorfismos genéticos nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* têm sido descritos para diversas doenças, já citadas anteriormente, em diferentes populações. Ao considerarmos que a população brasileira apresenta grande miscigenação racial, sendo descendente de três grupos raciais principais -: africanos, europeus e ameríndios (12) - torna-se relevante a descrição de polimorfismos genéticos dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* em uma população de Salvador (BA), em comparação com suas populações ancestrais (europeia e africana), bem como a avaliação de quais condições já foram descritas anteriormente, associadas a tais polimorfismos, em outras populações.

Material e Métodos

População do Estudo

Estudaram-se 506 indivíduos participantes de uma coorte, envolvendo asma e periodontite, cujo DNA genômico foi extraído e genotipado utilizando-se a plataforma Illumina. Incluíram-se no estudo indivíduos de ambos os sexos, com idade ≥ 18 anos, moradores de Salvador, Bahia, Brasil. Os parentes consanguíneos foram excluídos.

Esta pesquisa segue os requisitos éticos e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Comitê da Maternidade Climério de Oliveira (sob número de protocolo: 095/2012), coordenado pelo prof. Álvaro Cruz, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia.

Extração do DNA Genômico e Genotipagem

A extração do DNA foi realizada a partir de amostras de sangue de acordo com o protocolo do kit Gentra® Puregene® Blood Kit (Quiagen). A genotipagem foi realizada usando o Illumina Multi-Ethnic Global Array (MEGA, Illumina), grande Plataforma de varredura com 2,5 milhões de marcadores genotipados em todo genoma. Neste estudo, as informações genéticas foram extraídas de 59992543 a 60058521, posições localizadas no cromossomo 18 (*RANK*); de 43136872 a 43182149 posições localizadas no cromossomo 13 (*RANKL*); e de 119935796 a 119964124, posições localizadas no cromossomo 8 (*OPG*), versão do genoma: GRCh37. Considerando a mistura genética da população brasileira, usaram-se dados disponíveis no International HapMap Project (<http://www.hapmap.org/>), através do algoritmo de Tagger, usando o programa HaploView (<http://www.broad.mit.edu/mpg/tagger/>; <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) nas seguintes populações: indivíduos residentes de Utah nos Estados Unidos, com ancestralidade europeia setentrional e ocidental (CEU), indivíduos iorubás de Ibadan, Nigéria (YRI), e indivíduos da etnia *han* de Pequim, China (CHB). Após a realização dos ensaios, foram considerados para a análise SNP com taxa de genotipagem inferior a 0,98 e desequilíbrio de Hardy-Weinberg com valor de $p < 0.05$.

Análises in silico

As análises funcionais *in silico* foram realizadas para cada SNP analisado deste estudo, presente nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG*. Todas as variantes genéticas usadas neste estudo estão catalogadas em bancos de dados públicos, como o repositório de variantes dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) e a função de cada variante genética foi obtida no mesmo banco. O Desequilíbrio de Ligação (DL), que traz a associação de alelos no mesmo cromossomo, mas em *loci* diferentes, foi calculado pelo *software* Haploview 4.2, onde também foi calculado o grau de confiança no valor r^2 (79). O valor de $r^2 \geq 0,8$ foi considerado como alta correlação entre os SNP (80). Para a interpretação de polimorfismos regulatórios no genoma humano, utilizou-se o banco de dados RegulomeDB (www.regulomedb.org), que inclui alto rendimento, conjuntos de dados experimentais de ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) e outras fontes. De acordo com as análises, os SNP foram classificados em relação à influência na expressão gênica, à função da proteína e como ligação do fator de transcrição. No RegulomeDB, uma pontuação de 1 a 7 relaciona a probabilidade do impacto do SNP na

expressão do gene, onde pontuações de 1 a 3 podem afetar a ligação; de 4 a 6 têm menos evidências vinculativas; e não há informação disponível sobre a pontuação 7. O rSNPBase 3.0, um banco de dados regulatório dos SNP, além de fornecer anotações regulatórias intuitivas do SNP que podem ser usadas como orientação concreta para estudos de acompanhamento - o rSNPBase 3.0 - também permite uma visão mais sistemática dos potenciais mecanismos regulatórios relacionados aos seus SNP (82).

Marcadores de ancestralidade

As principais populações do Brasil são de origem europeia, africana e ameríndia. Assim, as populações utilizadas como pseudoancestrais foram as de origem do norte e oeste da Europa (CEU), indivíduos iorubás de Ibadan, Nigéria (YRI) e indivíduos *han* de Pequim, China (CHB). A população CHB demonstra ter frequências de alelo semelhantes aos nativos americanos (13). Para verificar essa diferença entre as populações que deram origem à população brasileira, utilizaram-se os AIM (do inglês Ancestry Informative Markers). Esses marcadores genéticos informativos de ancestralidade mostram grandes variações de diferencial de frequências alélicas ($\delta \geq 0.3$) entre duas populações de origens geográficas distintas (13) (83). Utilizou-se o IGSR (International Genome Sample Resource) (www.internationalgenome.org), plataforma de dados construída com base no *Projeto 1000 Genomas*, maior catálogo abertamente acessível de variação genômica humana, desenvolvido a partir de amostras que abrangem cinco continentes, para verificar a frequência de alelos nas populações ancestrais, através do navegador de genomas *Ensembl*, utilizando como referência o genoma GRCh37p.13 (84).

Resultados

Em relação ao gene *RANK*, os polimorfismos que tiveram a maior frequência do alelo polimórfico na população do estudo foram rs4941129, rs4369774, rs17069898, rs7239261, rs1805034, rs6567272, com este MAF variando entre 50% e 36%. Os SNP rs4941129, rs4369774, rs7239261 têm função intrônica e de transcrição gênica. O rs17069898 e o rs6567272 têm função intrônica e já o rs1805034 é *missense* podendo ter impacto na sequência de codificação. O rs35184120 também é *missense*, porém apresentou frequência de 1% na população em questão, ficando entre as menos frequentes, juntamente com rs9949037 e o rs60915364, ambos também com MAF de 1%. Sobre o *ranking* do RegulomeDB, destaca-se

a pontuação 1f do rs17069898, o que indica que possivelmente esse SNP está envolvido em funções reguladoras ou funcionais do gene *RANK* (Tabela 1). Dos polimorfismos mais frequentes na população aqui estudada, nenhum se apresentou como marcador informativo de ancestralidade quanto às populações pseudoancestrais (Tabela 4).

Para o gene *RANKL*, os polimorfismos que se mostraram mais frequentes na população estudada foram rs9525641, rs3742257, rs9533156, rs2200287, rs73174434, com frequência de menor alelo variando entre 46% e 27%. Os SNP rs3742257, rs2200287, rs73174434 apresentam função intrônica; e os rs9525641 e rs9533156, além dessa função, caracterizam-se como *upstream transcript variant*. O SNP rs138974661 é *missense* e teve a frequência do menor alelo (1%) baixa nessa população, bem como o rs866665000, também com MAF de 1 %. O rs2200287 destacou-se entre esses polimorfismos por apresentar impacto funcional 1d no RegulomeDB (Tabela 2). Nenhuma das variantes no *RANKL* se mostrou como AIM (Tabela 4).

Os polimorfismos genéticos mais frequentes no gene *OPG* na população estudada foram rs3102724, rs3134063, rs1032128, rs10505346 e rs4876869, com MAF variando entre 46 % e 25%. Todos dispõem da função intrônica, sendo que a variante rs10505346 também se caracteriza como *upstream intron*. Em relação ao impacto funcional, o rs3134063 se destacou com impacto funcional 1f no RegulomeDB, o que significa que provavelmente pode afetar a ligação e a expressão de um alvo genético. Já os polimorfismos menos frequentes em *OPG* nessa população foram o rs74418767 e o rs10955913 com MAF de 2%. (Tabela 3). Dos 5 polimorfismos mais frequentes na população estudada, somente o rs10505346 não se caracterizou como AIM (Tabela 4).

Tabela 1: Descrição dos polimorfismos em *RANK* na população estudada. Cromossomo, gene, polimorfismo, pares de base, alelos, frequência de menor alelo (MAF), função, equilíbrio de Hardy-Weinberg e Pontuação RegulomeDB.

CHR ^a	GENE	SNP	A1 ^b	A2 ^c	MAF	DBSNP	HWE	REGULOME DB (SCORE)
18	<i>RANK</i>	rs4941129	A	G	0.5	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	0.76	4
18	<i>RANK</i>	rs4369774	A	C	0.47	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	0.76	4
18	<i>RANK</i>	rs17069898	A	G	0.41	intron	0.27	1f
18	<i>RANK</i>	rs7239261	A	C	0.38	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	0.28	4

18	<i>RANK</i>	rs1805034	G	A	0.36	coding_sequence_variant,missense_variant	0.64	5
18	<i>RANK</i>	rs6567272	G	A	0.36	intron	0.76	5
18	<i>RANK</i>	rs8087597	G	A	0.31	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	0.17	3a
18	<i>RANK</i>	rs4355028	A	G	0.31	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	0.17	2b
18	<i>RANK</i>	rs12970081	A	G	0.30	intron	0.26	4
18	<i>RANK</i>	rs8099222	A	G	0.29	intron	0.01	5
18	<i>RANK</i>	rs4941132	A	T	0.26	intron	0.22	5
18	<i>RANK</i>	rs4426449	A	G	0.25	intron	0.67	7
18	<i>RANK</i>	rs58112300	G	A	0.24	intron	0.84	5
18	<i>RANK</i>	rs9951012	A	G	0.23	intron	0.24	4
18	<i>RANK</i>	rs6567266	A	G	0.19	intron	0.46	4
18	<i>RANK</i>	rs4940552	C	A	0.19	3_prime_UTR_variant,genic_downstream_transcript_variant	0.33	2b
18	<i>RANK</i>	rs12165104	A	G	0.16	intron	1	5
18	<i>RANK</i>	rs73963407	G	A	0.16	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	0.32	4
18	<i>RANK</i>	rs17720953	A	G	0.14	genic_upstream_transcript_variant,upstream_transcript_variant,intron_variant	0.49	4
18	<i>RANK</i>	rs4442919	C	G	0.14	intron	0.53	3a
18	<i>RANK</i>	rs7236029	G	A	0.14	3_prime_UTR_variant,genic_downstream_transcript_variant	0.21	4
18	<i>RANK</i>	rs79882996	A	G	0.12	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant,upstream_transcript_variant	1	4
18	<i>RANK</i>	rs3826618	G	A	0.11	intron	0.42	6
18	<i>RANK</i>	rs78325991	G	A	0.11	intron	0.04	5
18	<i>RANK</i>	rs884205	A	C	0.11	3_prime_UTR_variant	0.22	2b
18	<i>RANK</i>	rs55889857	G	A	0.11	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	0.40	5
18	<i>RANK</i>	rs12458117	A	G	0.10	intron	0.63	5
18	<i>RANK</i>	rs12959053	A	G	0.09	intron	0.15	5
18	<i>RANK</i>	rs72931598	A	G	0.08	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	0.59	5
18	<i>RANK</i>	rs76629319	C	A	0.08	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	0.11	4
18	<i>RANK</i>	rs34739845	G	A	0.08	intron	0.22	2b
18	<i>RANK</i>	rs11873734	G	A	0.06	intron	1	6
18	<i>RANK</i>	rs116698469	G	A	0.05	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant,upstream_transcript_variant	1	3a

18	<i>RANK</i>	rs56173102	A	G	0.05	intron	0.43	2b
18	<i>RANK</i>	rs12969154	A	G	0.05	intron	0.26	2b
18	<i>RANK</i>	rs75923485	A	G	0.04	intron	0.26	5
18	<i>RANK</i>	rs9956850	A	G	0.02	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	1	5
18	<i>RANK</i>	rs4500848	A	G	0.02	upstream_transcript, intron, genic_upstream_transcript	1	4
18	<i>RANK</i>	rs72933609	G	A	0.02	intron	1	5
18	<i>RANK</i>	rs9949037	A	C	0.01	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	1	3a
18	<i>RANK</i>	rs60915364	G	A	0.01	genic_upstream_transcript_variant,intron_variant	1	3a
18	<i>RANK</i>	rs35184120	A	G	0.01	coding_sequence_variant,intron_variant,missense_variant	1	4

Fonte: Dados do estudo.

Legenda: ^a cromossomo, ^b menor alelo, ^c alelo ancestral.

Tabela 2: Descrição dos polimorfismos em *RANKL* na população estudada. Cromossomo, gene, polimorfismo, pares de base, alelos, frequência de menor alelo (MAF), função, equilíbrio de Hardy-Weinberg e Pontuação RegulomeDB.

CHR ^a	GENE	SNP	A1 ^b	A2 ^c	MAF	DBSNP	HWE	REGULOME DB (SCORE)
13	<i>RANKL</i>	rs9525641	G	A	0.46	upstream_transcript_variant, intron_variant,genic_upstream_transcript_variant	0.76	4
13	<i>RANKL</i>	rs3742257	A	G	0.45	intron	0.45	5
13	<i>RANKL</i>	rs9533156	G	A	0.45	upstream_transcript_variant, intron_variant,genic_upstream_transcript_variant	1	4
13	<i>RANKL</i>	rs2200287	A	G	0.38	intron	0.53	1d
13	<i>RANKL</i>	rs73174434	G	A	0.27	intron	0.52	6
13	<i>RANKL</i>	rs9533154	A	G	0.26	intron_variant,genic_upstream_transcript_variant	0.51	5
13	<i>RANKL</i>	rs2277439	G	A	0.20	intron	1	5
13	<i>RANKL</i>	rs7334187	C	A	0.10	intron	0.70	5
13	<i>RANKL</i>	rs79843656	A	G	0.04	intron_variant,genic_upstream_transcript_variant	1	4
13	<i>RANKL</i>	rs866665000	A	G	0.01	genic_upstream_transcript_variant, upstream_transcript_variant,intron_variant	1	5
13	<i>RANKL</i>	rs138974661	A	G	0.01	missense_variant,coding_sequence_variant	1	6

Fonte: Dados do estudo.

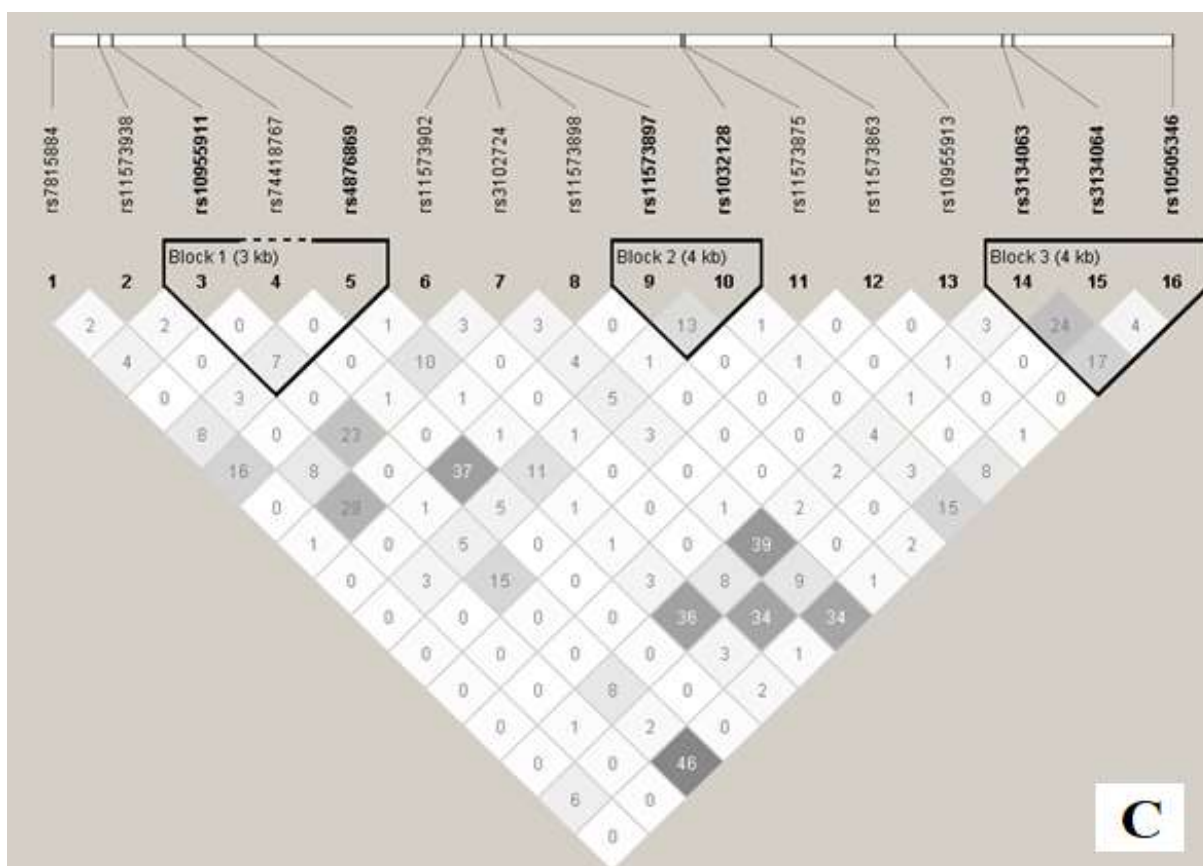
Legenda: ^a cromossomo, ^b menor alelo, ^c alelo ancestral.

Tabela 3: Descrição dos polimorfismos em *OPG* na população estudada. Cromossomo, gene, polimorfismo, pares de base, alelos, frequência de menor alelo (MAF), função, equilíbrio de Hardy-Weinberg e Pontuação RegulomeDB.

CHR ^a	GENE	SNP	A1 ^b	A2 ^c	MAF	DBSNP	HWE	REGULOME DB (SCORE)
8	<i>OPG</i>	rs3102724	A	G	0.46	Íntron	0.65	7
8	<i>OPG</i>	rs3134063	G	A	0.31	Íntron	0.48	1f
8	<i>OPG</i>	rs1032128	A	G	0.29	Íntron	0.73	7
8	<i>OPG</i>	rs10505346	A	C	0.27	2KB_upstream_variant, ítron_variant,upstream_transcript variant	0.84	4
8	<i>OPG</i>	rs4876869	G	A	0.25	ítron	0.84	4
8	<i>OPG</i>	rs7815884	A	G	0.19	3_prime_UTR_variant	0.26	5
8	<i>OPG</i>	rs10955911	A	G	0.17	Íntron	0.21	6
8	<i>OPG</i>	rs3134064	A	T	0.10	Íntron	0.48	6
8	<i>OPG</i>	rs11573938	A	G	0.09	Íntron	1	6
8	<i>OPG</i>	rs11573897	A	G	0.05	Íntron	1	5
8	<i>OPG</i>	rs11573898	A	G	0.04	Íntron	1	5
8	<i>OPG</i>	rs11573863	T	A	0.04	Íntron	1	5
8	<i>OPG</i>	rs11573902	C	A	0.04	Íntron	1	7
8	<i>OPG</i>	rs11573875	A	G	0.03	Íntron	1	6
8	<i>OPG</i>	rs74418767	A	G	0.02	Íntron	1	6
8	<i>OPG</i>	rs10955913	A	G	0.02	Íntron	1	4

Fonte: Dados do estudo.

Legenda: ^a cromossomo, ^b menor alelo, ^c alelo ancestral.



.Fonte: Dados do estudo.

Na análise do desequilíbrio de ligação (DL) entre os SNP do *RANK* (Fig.1A), *RANKL* (Figura1B) e *OPG* (Figura1C), os resultados são apresentados em valores percentuais. Na análise do r^2 , resultados superiores a 80% ($r^2 \geq 0,8$) indicam alta correlação, sendo considerados como um forte desequilíbrio de ligação. No gene *RANK*, alguns polimorfismos apresentaram valores que indicam alta correlação entre si: rs8087597 e rs4355028 ($r^2=1,0$), rs6567272 e rs1805034 ($r^2=0,99$). Os rs55889857 e rs76629319 apresentaram média correlação ($r^2=0,77$), assim como os polimorfismos rs55889857 e rs3826618 ($r^2=0,75$) (Figura 1A). Para o gene *RANKL*, os polimorfismos em desequilíbrio de ligação que tiveram alta correlação entre si foram: rs866665000 e rs138974661 ($r^2=1,0$), rs9533154 e rs73174434 ($r^2=0,97$), rs9533156 e rs9525641 ($r^2=0,87$) (Figura 1B). Nos SNP estudados, no gene *OPG*, não houve polimorfismos em desequilíbrio de ligação (Figura 1C)

Analisaram-se os polimorfismos nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* que não estavam em desequilíbrio de ligação quanto ao diferencial de frequências alélicas (δ) de populações pseudoancestrais de africanos (YRI), europeus (CEU) e ameríndios (CHB), com a finalidade de identificar os AIM (marcadores de ancestralidade). Após a análise do diferencial de frequências alélicas, dos 55 polimorfismos genéticos referentes aos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG*, somente 9 se caracterizaram como AIM, sendo que 2 polimorfismos em *RANK*

distinguem CHB para 2 pseudoancestrais YRI ou CEU (rs6567266 e rs12969154); já os demais polimorfismos em *RANK* distinguem YRI de CHB (rs4500848), YRI de CEU (rs58112300) e CEU de CHB (rs4426449). Para o gene *OPG*, 3 polimorfismos distinguem YRI de CEU (rs4876869, rs3102724, rs3134063) e 1 distingue CEU de CHB (rs1032128). Para o gene *RANKL*, nenhum polimorfismo se caracterizou como AIM.

Tabela 4 - Diferencial de frequências alélicas entre três populações diferentes do *Projeto 1000 Genomas* para os marcadores genéticos do banco de dados do estudo.

<i>RANK</i>								
rs ID	Alelos ^a	Alelo referência ^a	Frequência do alelo referência ^a			δ^b		
			YRI ^c	CEU ^d	CHB ^e	YRI-CEU	YRI-CHB	CEU-CHB
rs6567266	T/C	C	0,778	0,869	0,476	0,091	0,302	0,393
rs9956850	G/A	G	0,972	0,99	0,869	0,018	0,103	0,121
rs60915364	T/C	T	0,977	1	0,762	0,023	0,215	0,238
rs4941129	T/C	T	0,403	0,687	0,592	0,284	0,189	0,095
rs116698469	A/G	A	0,917	0,995	1	0,078	0,083	0,005
rs79882996	C/T	C	1	0,773	0,995	0,227	0,005	0,222
rs73963407	A/G	A	0,727	0,919	0,942	0,192	0,215	0,023
rs7239261	A/C	C	0,69	0,576	0,762	0,114	0,072	0,186
rs12969154	G/A	G	0,991	0,975	0,646	0,016	0,345	0,329
rs72931598	C/T	C	0,926	0,707	0,985	0,219	0,059	0,278
rs9949037	C/A	C	0,981	1	1	0,019	0,019	0
rs4369774	A/C	C	0,519	0,545	0,641	0,026	0,122	0,096
rs17720953	G/A	G	0,875	0,742	0,981	0,133	0,106	0,239
rs4500848	T/C	C	1	0,934	0,67	0,066	0,33	0,264
rs56173102	G/A	G	0,912	0,929	0,995	0,017	0,083	0,066
rs75923485	C/T	C	0,935	1	1	0,065	0,065	0
rs9951012	G/A	G	0,736	0,793	0,714	0,057	0,022	0,079
rs58112300	T/C	T	0,588	0,995	0,772	0,407	0,184	0,223
rs34739845	A/G	A	0,991	0,919	0,718	0,072	0,273	0,201
rs72933609	T/C	T	1	0,965	1	0,035	0	0,035

rs12458117	G/A	G	0,972	0,879	0,714	0,093	0,258	0,165
rs4442919	C/G	C	0,898	0,889	0,718	0,009	0,18	0,171
rs12970081	G/A	G	0,685	0,763	0,767	0,078	0,082	0,004
rs17069898	A/G	G	0,685	0,419	0,451	0,266	0,234	0,032
rs12959053	C/T	C	1	0,823	0,995	0,177	0,005	0,172
rs35184120	G/A	G	0,977	1	1	0,023	0,023	0
rs4426449	C/T	C	0,88	0,646	0,995	0,234	0,115	0,349
rs143271958	T/A	T	0,991	1	1	0,009	0,009	0
rs4941132	A/T	T	0,782	0,646	0,641	0,136	0,141	0,005
rs11873734	A/G	A	0,894	0,995	1	0,101	0,106	0,005
rs12165104	G/A	G	0,968	0,702	0,995	0,266	0,027	0,293
rs884205	A/C	C	0,958	0,758	0,801	0,2	0,157	0,043
rs4940552	A/C	A	0,759	0,848	0,859	0,089	0,1	0,011
rs7236029	A/G	A	0,81	0,939	0,903	0,129	0,093	0,036

RANKL

rs ID	Alelos ^a	Alelo referência ^a	Frequência do alelo referência ^a			δ^b		
			YRI ^c	CEU ^d	CHB ^e	YRI-CEU	YRI-CHB	CEU-CHB
rs79843656	G/A	G	1	0,949	1	0,051	0	0,051
rs2277439	G/A	A	0,801	0,859	0,723	0,058	0,078	0,136
rs7334187	T/G	T	0,847	1	1	0,153	0,153	0
rs2200287	G/A	G	0,713	0,626	0,762	0,087	0,049	0,136
rs3742257	T/C	C	0,514	0,439	0,515	0,075	0,001	0,076

OPG

rs ID	Alelos ^a	Alelo referência ^a	Frequência do alelo referência ^a			δ^b		
			YRI ^c	CEU ^d	CHB ^e	YRI-CEU	YRI-CHB	CEU-CHB
rs7815884	C/T	C	0,727	1	1	0,273	0,273	0
rs11573938	C/T	C	0,949	0,854	0,995	0,095	0,046	0,141

rs10955911	C/T	C	0,792	0,854	0,874	0,062	0,082	0,02
rs74418767	G/A	G	0,963	1	1	0,037	0,037	0
rs4876869	A/G	A	0,889	0,556	0,684	0,333	0,205	0,128
rs11573902	T/G	T	0,944	1	1	0,056	0,056	0
rs3102724	G/A	G	0,356	0,697	0,617	0,341	0,261	0,08
rs11573898	C/T	C	1	0,914	1	0,086	0	0,086
rs11573897	G/A	G	0,949	0,96	0,82	0,011	0,129	0,14
rs1032128	G/A	G	0,634	0,737	0,427	0,103	0,207	0,31
rs11573875	G/A	G	0,958	0,985	1	0,027	0,042	0,015
rs11573863	A/T	A	0,94	1	1	0,06	0,06	0
rs10955913	G/A	G	1	1	1	0	0	0
rs3134063	C/T	T	0,838	0,485	0,563	0,353	0,275	0,078
rs3134064	T/A	T	0,847	0,944	0,879	0,097	0,032	0,065
rs10505346	G/T	G	0,602	0,808	0,879	0,206	0,277	0,071

Fonte: Dados do estudo.

Legenda: ^a Dados provenientes da base de dados do Projeto 1000 Genomas; ^b Diferença entre frequências alélicas de populações da base de dados do Projeto 1000 Genomas; ^c Indivíduos iorubas de Ibadan, Nigéria (YRI); ^d Indivíduos residentes de Utah nos Estados Unidos, que possuem ancestralidade europeia setentrional e ocidental (CEU); ^e Chineses da etnia *han* de Pequim, China (CHB).

A **Tabela 5** descreve detalhes das variantes genéticas em *RANK* e *OPG* que apresentaram AIM maiores que 30%. Os SNP em *RANK* tiveram MAF de 25% para o alelo A na variante rs4426449, 24% para o alelo G na variante rs58112300, 19% para o alelo A na variante rs6567266, 5% para o alelo A na variante rs12969154 e 2% para o alelo A na variante rs4500848. Já os SNP em *OPG* apresentaram MAF que variou de 46 % para o alelo A na variante rs3102724, 31% para o alelo G na variante rs3134063, 29% para o alelo A na variante rs1032128 e 25% para o alelo G na variante rs4876869. Todos os polimorfismos são intrônicos.

Tabela 5 - Descrição dos polimorfismos em *RANK* e *OPG* com AIM maiores que 30%. Cromossomo, gene, polimorfismo, pares de base, alelos, frequência de menor alelo (MAF) e função.

CHR ^a	Gene	SNP	A1 ^b	A2 ^c	MAF	DBSNP
18	<i>RANK</i>	rs6567266	A	G	0.19	ítron
18	<i>RANK</i>	rs12969154	A	G	0.05	ítron
18	<i>RANK</i>	rs4500848	A	G	0.02	upstream_transcript, ítron, genic_upstream_transcript
18	<i>RANK</i>	rs58112300	G	A	0.24	ítron
18	<i>RANK</i>	rs4426449	A	G	0.25	ítron
8	<i>OPG</i>	rs4876869	G	A	0.25	ítron
8	<i>OPG</i>	rs3102724	A	G	0.46	ítron
8	<i>OPG</i>	rs1032128	A	G	0.29	ítron
8	<i>OPG</i>	rs3134063	G	A	0.31	ítron

Fonte: Dados do estudo.

Legenda: ^a cromossomo, ^b menor alelo, ^c alelo ancestral.

Mecanismos de regulação foram atribuídos aos SNP analisados e identificados na Tabela 6. Os rs6567266 e rs58112300 estão envolvidos em regulação proximal. Nenhum dos polimorfismos está envolvido em regulação distal e nem em regulação miRNA. A regulação mediada por proteína de ligação a RNA foi um mecanismo associado a todos os SNP. Na mesma tabela, apresentaram-se dados regulatórios e funcionais pontuados através de score pelo RegulomeDB para cada variante. Os escores mais baixos - 1f da variante rs3134063 e 2b da variante rs12969154 - indicam que esses SNP podem estar envolvidos em regiões reguladoras e funcionais. Os escores mais altos - 4 (rs4876869, rs6567266 e rs4500848), 5 (rs58112300) e 7 (rs3102724, rs1032128 e rs4426449) - significam que provavelmente esses polimorfismos não estão envolvidos diretamente em processos funcionais.

Tabela 6 - Função dos SNP em *RANK* e *OPG* a partir de análises *in silico*, utilizando rSNPBase e RegulomeDB.

SNP	Regulação proximal	Regulação distal	Regulação miRNA	Regulação mediada por proteína de ligação a RNA	RegulomeDB (Score)
rs6567266	Sim	não	não	Sim	4
rs12969154	Não	não	não	Sim	2b
rs4500848	Não	não	não	Sim	4
rs58112300	Sim	não	não	Sim	5
rs4426449	Não	não	não	Sim	7
rs4876869	Não	não	não	Sim	4
rs3102724	Não	não	Não	Sim	7
rs1032128	Não	não	Não	Sim	7
rs3134063	Não	não	Não	Sim	1f

Fonte: Dados do estudo.

Predição para SNP do Regulome DB.

Discussão

Este estudo descreveu a frequência de polimorfismos genéticos e a probabilidade regulatória dos polimorfismos nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG*, em uma população da região Nordeste do Brasil, juntamente com a análise da distribuição de frequências de populações pseudoancestrais, onde os polimorfismos já foram descritos anteriormente e associados a diversas doenças. A ancestralidade africana (YRI) é a predominante na população de Salvador, com média de 50,5%, seguida pelos europeus (CEU), com média de 42,4%, e por último os americanos nativos (CHB), com média de 5,8% (12).

Um dos genes estudados nessa população foi a osteoprotegerina (*OPG*), receptor da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), produto do gene *TNFRSF11B*, importante regulador negativo da osteoclastogênese, secretada por osteoblastos e células estromais. Polimorfismos nesse gene foram associados à osteoporose e à risco de fratura óssea (85). Alguns polimorfismos genéticos em *OPG* apresentaram-se como AIM neste estudo (Tabela 4), sendo eles rs4876869, rs3102724, rs1032128 e rs3134063. O rs4876869 foi relacionado à densidade mineral óssea, numa maioria de mulheres pós-menopausa, em uma coorte de 721 espanholas, e os resultados observaram a associação do polimorfismo rs4876869 (A >G) localizado no íntron 2 do gene *TNFRSF11B* à densidade mineral óssea (principalmente no colo do fêmur), porém não foi estatisticamente significativa. As mulheres com os genótipos GG/GA tenderam a ter melhores parâmetros ósseos no colo do fêmur, porém não foi estatisticamente significativa (8). Na presente população, a frequência do menor alelo G foi de 25% e do alelo

ancestral A, 75% (Tabela 5). Já o polimorfismo genético rs3102724 em *OPG* teve seu alelo A associado à reabsorção externa apical da raiz dental em pacientes brancos das regiões Sul e Sudeste do Brasil, com média de idade de 14,9 anos, tratados ortodonticamente de maloclusão de classe II (86). Na população estudada, a presença do alelo A foi bastante relevante, mostrando uma frequência de 46% (Tabela 5). Esse mesmo polimorfismo também foi associado à baixa densidade óssea mineral na coluna lombar em homens de centros europeus, com a frequência de 35% do alelo polimórfico A, porém, sem significância estatística (87). Em relação ao rs1032128 em *OPG* que, na população estudada, teve a frequência do menor alelo A de 29% (Tabela 5), este foi relacionado com diversas doenças, como pé diabético, numa população polonesa, onde o alelo A foi considerado alelo de risco para essa condição patológica (88). O mesmo polimorfismo apresentou fortes riscos para a osteoporose da cabeça femoral, induzida por álcool, em um modelo recessivo, no genótipo GG, também numa população chinesa (5), bem como efeito negativo do menor alelo G para a osteoartrite de joelho, numa população chinesa (89). O alelo ancestral G na população deste estudo teve frequência de 71% (Tabela 5). Outro polimorfismo genético encontrado em *OPG*, o SNP rs3134063, foi analisado em uma pesquisa para 2027 pacientes espanhóis com artrite reumatoide, porém não foi observada associação entre polimorfismos do gene *OPG* e doença cardiovascular em todo o grupo de pacientes (90).

Outro gene pesquisado neste estudo, o *RANK*, liga-se ao receptor-ativador do fator nuclear-ligante κ B (*RANKL*) na superfície dos precursores de osteoclastos, desencadeando a osteoclastogênese (32). Cinco polimorfismos genéticos em *RANK* apresentaram-se como AIM no presente estudo: rs6567266, rs12969154, rs4500848, rs58112300 e rs4426449 (Tabela 4). Estudo envolvendo 501 mulheres chinesas na pós-menopausa, com osteoporose ou osteopenia, que receberam alendronato (70 mg por semana) por via oral durante um ano, mostrou que o haplótipo AG do rs12969154, em *RANK*, foi fator de proteção genética em relação a uma densidade mineral óssea das vértebras L1 à L4 mais alta (7). A frequência do alelo polimórfico A no presente estudo foi de 5% (Tabela 5). O rs12969154 apareceu num estudo que comparou mongóis com outras cinco populações: os chineses *han* em Pequim, China (CHB), os japoneses em Tóquio, Japão (JPT), uma população do norte e oeste da Europa (CEU), os iorubás em Ibadan, Nigéria (YRI) e uma população do noroeste da China. Mas não houve diferença estatisticamente significativa desse SNP entre essas populações. A frequência do menor alelo A para o rs12969154 na população genotipada da Mongólia e do noroeste da China foi de 35,5% (91). Para o SNP rs4500848, encontrou-se associação com a idade em que mulheres chinesas

entraram na menopausa. Os indivíduos com o genótipo T/T tiveram um início mais precoce da menarca em 0,59 anos do que aqueles com o genótipo C / C. Se esta acontece muito cedo, a mulher tem maior risco de desenvolver câncer de mama e ovário, problemas metabólicos e diabetes tipo 2. Já a menopausa tardia oferece um maior risco de osteoporose (92). Outro polimorfismo genético em *RANK*, o rs4426449, foi analisado em diversos estudos, nas mais diversas populações, como na associação com a altura do adulto em chineses (93), idade da menopausa em mulheres brancas americanas (94) e obesidade em chineses (95), mas não mostrou correlação com nenhum dos desfechos estudados.

Conclusão

Identificaram-se diversos polimorfismos genéticos nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG*, com variadas frequências, e tiveram seus alelos mais frequentes associados às populações pseudoancestrais da população brasileira como marcadores de ancestralidade, com predomínio nas populações YRI (africanos) e CEU (europeus). Entre os polimorfismos que se caracterizaram com marcadores de ancestralidade, o rs3134063 do gene *OPG* e o rs12969154 do gene *RANK* mostraram-se como possivelmente envolvidos em regiões reguladoras e funcionais desses genes, podendo impactar na transcrição da proteína que codificam. Esses polimorfismos foram associados a diversos desfechos em outras populações, como padrão da densidade óssea mineral, pé diabético, osteoartrite, osteoporose, artrite reumatoide e idade em que as mulheres entraram na menopausa. Outros estudos que pesquisem a frequência de polimorfismos genéticos nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* são necessários, visto que esses genes participam de inúmeros processos fisiológicos e patológicos.

6.2 ARTIGO 2

INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES *RANK*, *RANKL* e *OPG* NA PERIODONTITE

Introdução

Milhares de pessoas são afetadas todos os anos pela periodontite (77), doença muito comum que afeta até 50% da população adulta (24), cuja patogênese está pautada na balança

entre a ação de um biofilme subgingival disbiótico e a resposta imune do hospedeiro. Esse processo dinâmico sofre ainda influência de outros fatores relacionados ao hospedeiro, que podem ser fatores intrínsecos, como padrão genético da resposta imune ou extrínsecos, como o fumo; o que resulta numa grande variação na resposta inflamatória que leva à destruição dos tecidos de suporte do dente (96).

As bactérias patogênicas envolvidas na doença estimulam uma inflamação local e, assim, o sistema imunológico inato do hospedeiro é ativado. Nesse processo, estão envolvidas uma série de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 e o fator de necrose tumoral alfa, que agem sobre células da lesão. Os linfócitos B e T também desempenham papel importante nessa cascata de eventos que pode levar à perda óssea, através da ativação do eixo fator nuclear kappa B, composto pelo receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), ou TNFRSF11A – ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), ou TNFSF11 – osteoprotegerina (OPG), ou TNFRSF11B, estimulando a diferenciação de células precursoras de macrófagos em osteoclastos, bem como a maturação e sobrevivência dessas células (75).

O principal mecanismo que regula a reabsorção e a deposição óssea que ocorrem no processo de remodelação óssea é a proporção de RANKL para OPG (33). O RANKL está presente em vários tipos de células, como fibroblastos, linfócitos B e linfócitos T (75) e se liga ao RANK nos precursores dos osteoclastos, resultando na diferenciação destes em macrófagos ativos, que secretam enzimas e, com isso, degradam o osso. Altas concentrações de OPG evitam a perda óssea, já que a ligação RANK-RANKL é impedida, pois OPG é um receptor solúvel de RANKL. A transformação de proteínas morfogênicas ósseas relacionadas ao fator de crescimento β é o que regula os níveis de OPG. E um aumento de citocinas pró-inflamatórias no tecido periodontal, como IL-1 β e TNF, aumentam a quantidade de RANKL em relação a OPG, levando à perda óssea (77). É conhecido que o desequilíbrio no processo de remodelamento óssea leva à reabsorção do osso. O excesso de osteoclastos em atividade está relacionado com outras doenças além da periodontite, como a osteoporose, a artrite reumatoide, mielomas múltiplos e cânceres metastáticos (33).

Existe grande interesse em investigar a influência de variantes alélicas de genes na doença periodontal. Assim, as descobertas de variantes genéticas associados à periodontite têm aumentado consistentemente (97).

Diante do exposto, deve-se considerar a relevância de conhecer as características das variantes genéticas em *RANK*, *RANKL* e *OPG* e suas ligações com doenças já descritas, bem

como realizar estudos que analisem a relação desses genes e suas variantes, com a periodontite na população deste estudo.

Material e Métodos

População de estudo

Realizou-se um estudo transversal com 506 indivíduos acometidos de asma e periodontite, participantes de uma coorte, moradores de Salvador, Bahia, Brasil. Inicialmente, 1179 indivíduos foram avaliados e tiveram o DNA genômico extraído e genotipado utilizando-se a plataforma Illumina Multi-Ethnic Global Array (MEGA, Illumina). Excluíram-se parentes consanguíneos e foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos, adultos (≥ 18 anos), com idade média de 45.6 ± 12.77 anos, sendo 421 mulheres e 85 homens. Após essa primeira etapa, foi feito o controle de qualidade das amostras e a exclusão de indivíduos com inconsistências ou ausência de informações pessoais e aqueles que não tinham dados da avaliação periodontal. Adicionalmente, realizou-se a exclusão de indivíduos com genotipagem inferior ou igual a 90%, exclusão de SNV com frequência de alelo inferior ou igual a 1% e selecionados SNV cujo HWE, em indivíduos sem o diagnóstico de periodontite (controle), apresentaram valor de $p > 0.05$. Assim, foi composta a população do estudo com 506 indivíduos ($n=506$).

Para as análises de associação das variantes dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* e periodontite, os indivíduos do estudo foram divididos em Grupo Caso, classificados com presença de periodontite ($n=117$) e Grupo Controle, sem o diagnóstico de periodontite ($n=389$) (74). Realizou-se uma entrevista para obtenção de dados relacionados às características socioeconômico-demográficas, hábitos e estilo de vida, história médica e odontológica e acesso aos cuidados de saúde bucal. Esta pesquisa segue os requisitos éticos e aprovada pela CONEP e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Comitê da Maternidade Climério de Oliveira, CAAE: 25000.013834/2010-96.

Avaliação periodontal

Após a entrevista, os indivíduos foram encaminhados para um exame oral completo, realizado por um único examinador previamente treinado por periodontista experiente. Os índices Kappa intra e interexaminador obtidos demonstraram boa concordância das medidas

clínicas. Para o diagnóstico de periodontite, estabeleceram-se parâmetros de acordo com Gomes-Filho (74, 98) Page e Eke (99) e Eke e colaboradores (100) que envolvem níveis clínicos de inserção, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e índice de placa visível. Os indivíduos foram classificados como presença, aqueles com no mínimo ≥ 4 dentes com ≥ 1 sítios com profundidade de sondagem ≥ 4 mm, nível de inserção clínica ≥ 3 mm e sangramento à sondagem no mesmo sítio; ou ausência de periodontite.

Extração do DNA genômico e genotipagem

A extração do DNA foi realizada a partir de amostras de sangue de acordo com o protocolo do kit Gentra® Puregene® Blood Kit (Quiagen). Todas as amostras foram uniformizadas à concentração de 50 ng/ μ l, identificadas em tubos com códigos de barras e armazenadas a -30°C até seu uso. A genotipagem foi realizada usando o Illumina Multi-Ethnic Global Array (MEGA, Illumina). As informações genéticas foram extraídas de 59992543 a 60058521, posições localizadas no cromossomo 18 (RANK); de 43136872 a 43182149, posições localizadas no cromossomo 13 (RANKL); e de 119935796 a 119964124, posições localizadas no cromossomo 8 (OPG), versão do genoma: GRCh37. Para controle de qualidade, aplicaram-se os seguintes filtros: taxa de genotipagem inferior a 90 %; equilíbrio de Hardy-Weinberg com valor de $p < 0.05$ no grupo controle e frequência do menor alelo (MAF) menor ou igual a 1%.

Análise funcional in silico

As análises funcionais *in silico* foram realizadas para cada variante genética analisada neste estudo presente nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG*. Todas as variantes genéticas usadas neste estudo estão catalogadas em bancos de dados públicos, como o repositório de variantes dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). O Desequilíbrio de Ligação (DL), que traz a associação de alelos no mesmo cromossomo, mas em *loci* diferentes, foi calculado pelo *software Haploview 4.2*, onde também foi calculado o grau de confiança no valor r^2 (79). O valor de $r^2 \geq 0,8$ foi considerado de alta correlação entre os SNV (80). A função de cada variante genética foi obtida através do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para a interpretação de variantes regulatórias no genoma humano, utilizou-se o banco de dados *RegulomeDB* (www.RegulomeDB.org), que inclui alto

rendimento, conjuntos de dados experimentais de ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) e outras fontes. O *Genotype-Tissue Expression Project* GTEx (www.gtexportal.org) foi utilizado como uma base de dados de expressão gênica em um banco de tecidos variados (82). Da plataforma *HaploReg* v4.1 foram extraídas informações sobre o impacto funcional de cada SNV em diferentes tecidos e células, como tecidos com fibroblastos e osteoblastos primários. O banco de dados *String* (www.string-db.org) foi utilizado para verificar as interações entre os genes.

Estratégia estatística

Neste trabalho, informações genéticas foram extraídas de 59992543 a 60058521, posições localizadas no cromossomo 18 (*RANK*); de 43136872 a 43182149, posições localizadas no cromossomo 13 (*RANKL*); e de 119935796 a 119964124, posições localizadas no cromossomo 8 (*OPG*), versão do genoma: GRCh37. Após a realização dos ensaios, foram considerados para análise SNV com taxa de genotipagem inferior a 0,98 e Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com valor de $p < 0.05$. Para investigar a associação de variantes genéticas nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* e a periodontite, utilizou-se um banco com dados imputados, o que foi feito remotamente, usando o servidor Michigan Imputation (<https://www.caapa-project.org/>). Realizaram-se análises através do *software PLINK 1.9* por regressão logística, em três modelos - aditivo, dominante e recessivo – ajustada por idade, obesidade, hábito de respirar pela boca, uso de fio dental (pelo menos uma vez ao dia), asma e componente principal de ancestralidade da amostra. Para os resultados foram determinados valores de *Odds Ratio* (OR) e Intervalo de Confiança (IC). Foi considerado $MAF > 0.01$ e o valor de $p \leq 0.05$.

Para a escolha das covariáveis, inicialmente as mesmas foram verificadas com o desfecho através do teste qui-quadrado. Treze variáveis dicotômicas apresentaram associação com o desfecho. Para a decisão do melhor modelo de ajuste, excluíram-se as variáveis que apresentaram um n igual ou inferior a 5 em algum dos dois grupos (caso e controle). A seguir, procedeu-se à regressão logística com o teste de bondade de *Hosmer Lemeshow* através do programa SPSS, versão 20. O melhor modelo de ajuste apresentou as variáveis idade, obesidade ($IMC >$ ou igual a 30), hábito de respiração pela boca, uso do fio dental ao menos uma vez ao dia e presença de asma. Componente principal de ancestralidade também foi utilizado como covariável nas análises de associação, considerando-se que a população que compõe o estudo é miscigenada e não foi testada no modelo de ajuste por ser uma variável contínua.

Resultados

População do estudo

A população do estudo foi composta por 506 indivíduos (n=506), de ambos os sexos, sendo 421 mulheres (83,2%) e 85 homens (16,8%), classificados como Grupo Caso, com presença de periodontite (n=117) e Grupo Controle, sem o diagnóstico de periodontite (n=389) (74). 165 indivíduos tinham idade entre 18 e 39 anos (32,6%) e 341 indivíduos, idade maior a 39 anos (67,4%). 101 contavam com mais de 4 anos de escolaridade (20%) e 405, com 4 anos ou menos (80%). Quanto à raça autorreferida, 421 indivíduos autodeclararam-se negros/pardos (83,2%) e 85 brancos (16,8%). Em relação à obesidade, 149 indivíduos tiveram IMC>30 (29,4%), 314 foram classificados com presença de asma (62,1%) e 176 como fumantes (34,8%). A **Tabela 1** mostra as características das covariáveis utilizadas no estudo, a **Tabela 2**, as comorbidades dos participantes presentes da amostra e a **Tabela 3** o histórico odontológico dos participantes da amostra.

Tabela 1: Frequências absolutas e relativas das características da amostra utilizadas como covariáveis neste estudo para periodontite (n=506)

Características	Classificação	N	(%)
Idade	18 – 39 anos	165	32,6
	> 39anos	341	67,4
Sexo	Mulheres	421	83,2
	Homens	85	16,8
Escolaridade	> 4 anos	101	20
	≤ 4 anos	405	80
Raça autorreferida	negra/parda	421	83,2
	Branca	85	16,8
Obesidade	IMC > 30	149	29,4
Asma	Presença	314	62,1
Fumo	Sim	176	34,8

Fonte: Dados do estudo.

Tabela 2: Comorbidades para doença periodontal presentes na amostra (n = 506).

Comorbidade	N	(%)
IMC < 25	150	29,6
IMC ≥ 30	149	29,4
Gengivite	14	2,8
Hipertensão	142	28,1
Diabetes	27	5,3
Osteoporose	18	3,6
Presença de rinite	157	31
Presença de doenças sexualmente transmissíveis	5	1
Presença de anemia	6	1,2
Presença de doença renal	4	0,8
Presença de cardiopatias	18	3,6
Presença de hipercolesterolemia	58	11,5
Diagnóstico positivo de neoplasia	5	1
Presença de doença hepática	2	0,4
Presença de doenças gástricas	53	10,5
Presença outras alterações na saúde	70	13,8

Fonte: Dados do estudo.

Tabela 3: Histórico odontológico dos indivíduos presentes na amostra (n = 506).

Variável	N	(%)
Presença de respiração bucal	319	63
Consulta regularmente ao dentista	252	49,8
Nunca/foi ao dentista a mais de 1 ano	280	55,3
Foi ao dentista a menos de 1 ano	226	44,7
Já recebeu orientações de higiene oral	401	79,2
Já perdeu algum dente permanente	442	87,4
Motivo perda = cárie	363	71,7
Motivo da perda = trauma	15	3
Motivo da perda = DP	43	8,5
Motivo da perda = ortodontia	15	3
Motivo da perda = outro	11	2,2
Última exodontia < 6 meses	26	5,1
Última exodontia 6 meses – 1 ano	9	1,8
Última exodontia 1 – 2 anos	31	6,1
Última exodontia > 2 anos	381	75,3
Não perderam dente permanente	59	11,7
Presença de mal oclusão	362	71,5
Presença de lesão de tecido mole	40	7,9
Já realizou alguma cirurgia	243	48

Fonte: Dados do estudo.

Associação entre variantes genéticas nos genes RANK, RANKL e OPG e a periodontite

Extraíram-se do chip de genotipagem Illumina, 292 SNV em *RANK*, 176 SNV em *RANKL* e 146 em *OPG* e após a análise de regressão logística encontrou-se associação entre o gene em questão e a periodontite, em 36 SNV em *RANK* e, destes, 9 SNV foram excluídos por apresentarem intervalo de confiança maior que 3 vezes o valor da OR; 21 SNV foram associados em *RANKL*, mas 10 foram excluídos pelo mesmo motivo e 2 SNV foram associados em *OPG*.

Gene *RANK* x Periodontite

Para o gene *RANK*, todos os 27 SNV têm função intrônica e a frequência do menor alelo na população estudada variou entre 2% e 49% (**Tabela 4**). Destes SNV, 7 mostraram-se negativamente associados à periodontite (**Tabela 5**) e 20 positivamente. (**Tabela 6**).

Entre os SNV associados negativamente à periodontite, o rs12605579 (alelo A) e rs34432351 (alelo A) foram associados nos modelos aditivo (OR 0,59 e IC 95% 0,38-0,89) e dominante (OR 0,54 e IC 95% 0,34-0,87) (**Tabela 5**) e estão em perfeito equilíbrio de ligação (Figura 1). O rs4941125 teve seu alelo G associado nos modelos aditivo (OR 0,60 e IC 95% 0,39-0,90) e dominante (OR 0,55 e IC 95% 0,34-0,88) e o rs4941126 teve seu alelo C associado nos modelos aditivo (OR 0,61 e IC 95% 0,41-0,93) e dominante (OR 0,55 e IC 95% 0,34-0,88) (**Tabela 5**), e esses dois SNV estão em alto desequilíbrio de ligação ($r^2=0,96$) (Figura 1). O rs12962830 teve seu alelo A associado no modelo recessivo (OR 0,48 e IC 95% 0,24-0,97) (**Tabela 5**) e não está em desequilíbrio de ligação com nenhum outro SNV (Figura 1). O rs8083511 apresentou associação do alelo T no modelo dominante (OR 0,59 e IC 95% 0,38-0,92) e o rs6567273 teve seu alelo G associado no modelo recessivo (OR 1,33 e IC 95% 0,81-2,19) (**Tabela 5**).

Em relação aos SNV que tiveram associação positiva para a periodontite, o rs79884073 apresentou seu alelo C associado nos modelos aditivo e dominante (OR 4,27 e IC 95% 1,70-10,75) (**Tabela 6**). Este SNV está no mesmo haplótipo com os rs6567273 e o rs8083511, que tiveram associação negativa para a periodontite (Figura 1).

Os SNV rs72931589 (alelo T), rs72931590 (alelo A), rs12954058, rs72931591, rs62098350 (os 3 com menor alelo G) apresentaram associação positiva à periodontite no modelo aditivo (OR 1,69 e IC 95% 1,09-2,63) (**Tabela 6**) e estão em perfeito LD ($r^2=1,0$)

(Figura 1). O rs798822996 apresentou associação negativa do seu alelo T para a periodontite nos modelos aditivo (OR 1,77 e IC 95% 1,13-2,79) e dominante (OR 1,97 e IC 95% 1,19-3,28) (**Tabela 5**) e tem alta correlação ($r^2=0,95$) (Figura 1) com os outros 5 SNV citados anteriormente.

Outros 4 SNV que apresentaram LD entre si ($r^2=1,0$) (Figura 1) foram o rs4371263, com o menor alelo G, e os rs4524033, rs4436867, rs7504969, todos com menor alelo A, e associação positiva à periodontite, nos modelos aditivo (OR 1,58 e IC 95% 1,01-2,45) e dominante (OR 1,68 e IC 95% 1,01-2,81) (**Tabela 6**).

O rs10163810 apresentou alelo T associado positivamente à periodontite, nos modelos aditivo (OR 1,69 e IC 95% 1,09-2,63), e dominante (OR 1,85 e IC 95% 1,12-3,07) (**Tabela 6**) e mostrou-se em perfeito LD ($r^2=1,0$) com os SNV rs72931589, rs72931590, rs12954058, rs72931591, rs62098350 e alta correlação com os SNV o rs4371263, rs4524033, rs4436867, rs7504969 e rs798822996 ($r^2=0,95$) (Figura 1). Assim como o rs12605579, que foi associado negativamente à periodontite (**Tabela 5**) e tem alta correlação ($r^2=1,0$) com todos estes SNV (Figura 1).

O rs10163762 teve seu alelo T associado positivamente à periodontite nos modelos aditivo (OR 1,70 e IC 95% 1,10-2,63) e dominante (OR 1,86 e IC 95% 1,12-3,08) (**Tabela 6**), tem LD ($r^2=1,0$) com os SNV rs12605579 e rs34432351 que associaram negativamente à doença (**Tabela 5**) e alta correlação ($r^2=0,88$) (Figura 1) com o rs12150741, que teve seu alelo C associado positivamente à periodontite nos modelos aditivo (OR 1,68 e IC 95% 1,09-2,58) e dominante (OR 1,89 e IC 95% 1,14-3,12) (**Tabela 6**).

Outra relação de perfeito LD ($r^2=1,0$) (Figura 1) acontece entre o rs11152341, que teve seu alelo G associado positivamente à periodontite nos modelos aditivo (OR 1,61 e IC 95% 1,05-2,43) e dominante (OR 1,88 e IC 95% 1,14-3,11) (**Tabela 6**) e o rs56382559, que apresentou também o menor alelo G significativo nos modelos aditivo (OR 1,61 e IC 95% 1,05-2,46) e dominante (OR 1,88 e IC 95% 1,14-3,11) (**Tabela 6**). Há também forte correlação ($r^2=0,99$) (Figura 1) entre o rs11152341 e o rs55850220, no qual o alelo A foi associado positivamente à periodontite nos modelos aditivo (OR 1,61 e IC 95% 1,05-2,47) e dominante (OR 1,89 e IC 95% 1,14-3,12) (**Tabela 6**).

Três SNV apresentaram fraca correlação com os demais SNV. O rs12962830 apresentou o alelo A associado negativamente à periodontite no modelo recessivo (OR 0,48 e IC 95% 0,24-

0,97) (**Tabela 5**), o rs28521082 apresentou o alelo A associado positivamente no modelo dominante (OR 1,70 e IC 95% 1,00-2,88) e o rs116487658 também apresentou associação positiva à periodontite, modelos aditivo (OR 1,60 e IC 95% 1,07-2,41) e dominante (OR 1,78 e IC 95% 1,09-2,91) (**Tabela 6**).

Tabela 4: Descrição genética e funcional dos SNV em *RANK*.

GENE <i>RANK</i> SNV	MAF	A1	A2	DBSNP	Regulome DB	HWE
rs72931559	0.2994	T	C	Íntron	4	0.5963
rs79884073	0.02273	C	T	Íntron	5	1
rs79882996	0.1117	T	C	Íntron	4	0.4976
rs34432351	0.2055	A	G	Íntron	3a	0.1732
rs12605579	0.2055	A	G	Íntron	5	0.1732
rs4941125	0.2095	G	A	Íntron	1f	0.5014
rs10163762	0.1156	T	G	Íntron	7	0.187
rs12150741	0.1196	C	T	Íntron	5	0.1347
rs10163810	0.1166	T	C	Íntron	6	0.1917
rs72931589	0.1166	T	G	Íntron	5	0.1917
rs72931590	0.1166	A	G	Íntron	5	0.1917
rs12954058	0.1166	G	A	Íntron	4	0.1917
rs72931591	0.1166	G	A	Íntron	3a	0.1917
rs62098350	0.1166	G	A	Íntron	4	0.1917
rs4941126	0.2164	C	G	Íntron	6	0.2406
rs116487658	0.1334	T	C	Íntron	4	0.7992
rs55850220	0.1206	A	G	Íntron	2b	0.05789
rs56382559	0.1215	G	A	Íntron	4	0.06193
rs11152341	0.1215	G	A	Íntron	4	0.06193
rs4371263	0.1136	G	A	Íntron	3a	0.1234
rs4524033	0.1136	A	G	Íntron	5	0.1234
rs4436867	0.1136	A	C	Íntron	4	0.1234
rs7504969	0.1136	A	G	Íntron	4	0.1234
rs8083511	0.3142	C	A	Íntron	5	0.7571
rs6567273	0.4931	A	T	Íntron	5	0.8591
rs28521082	0.1087	G	A	Íntron	4	0.3536
rs12962830	0.3706	A	G	Íntron	3a	0.9242

Fonte: Dados do estudo

Legenda; SNV: variante de nucleotídeo único. MAF: frequência de menor alelo. A1: menor alelo. A2: alelo ancestral. DBSNP: função no DBSNP. Predição para SNV do Regulome DB. HWE: equilíbrio de Hardy Weinberg.

Tabela 5: Associação significativa entre variantes no gene *RANK* e negativa à periodontite, por regressão logística ajustado por idade, obesidade, hábito de respirar pela boca, uso de fio dental (pelo menos uma vez ao dia), asma e componente principal de ancestralidade da amostra.

<i>RANK</i>									
SNV	A1/A2	Modelo	Genótipo	Controle (%)	Caso (%)	OR	IC95%	valor p	p Perm
rs12605579	A/G	ADD	GG	229(58.87)	85(72.65)	0.59	0.38-0.89	0.013	0.014
			GA	147(37.79)	29(24.79)				
			AA	13(3.34)	3(2.56)				
		DOM	GG	229(58.87)	85(72.65)	0.54	0.34-0.87	0.011	0.013
			GA+AA	160(41.13)	32(27.35)				
			REC	GG+GA	376(96.66)				
AA	13(3.34)	3(2.56)							
rs34432351	A/G	ADD	GG	229(58.87)	85(72.65)	0.59	0.38-0.89	0.013	0.014
			GA	147(37.79)	29(24.79)				
			AA	13(3.34)	3(2.56)				
		DOM	GG	229(58.87)	85(72.65)	0.54	0.34-0.87	0.011	0.013
			GA+AA	160(41.13)	32(27.35)				
			REC	GG+GA	376(96.66)				
AA	13(3.34)	3(2.56)							
rs4941125	G/A	ADD	AA	228(58.61)	85(72.65)	0.60	0.39-0.90	0.015	0.018
			AG	146(37.53)	28(23.93)				
			GG	15(3.86)	4(3.42)				
		DOM	AA	228(58.61)	85(72.65)	0.52	0.33-0.84	0.008	0.008
			AG+GG	161(41.39)	32(27.35)				
			REC	AA+AG	374(96.14)				
GG	15(3.86)	4(3.42)							
rs4941126	C/G	ADD	GG	223(42.67)	83(70.94)	0.61	0.41-0.93	0.020	0.023
			GC	151(38.82)	30(25.64)				
			CC	15(3.86)	4(3.42)				
		DOM	GG	223(42.67)	83(70.94)	0.55	0.34-0.88	0.012	0.014
			GC+CC	166(57.33)	34(29.06)				
			REC	GG+GC	374(96.14)				
CC	15(3.86)	4(3.42)							
rs12962830	A/G	ADD	M	153(39.33)	48(41.03)	0.82	0.59-1.12	0.211	0.210
			GA	177(45.50)	58(49.57)				
			AA	59(15.17)	11(9.40)				
		DOM	GG	153(39.33)	48(41.03)	0.94	0.60-1.47	0.782	0.727
			GA+AA	236(60.67)	69(58.97)				
			REC	GG+GA	330(84.83)				
AA	59(15.17)	11(9.40)							
rs8083511	T/C	ADD	CC	65(55.56)	171(43.96)	0.82	0.58-1.16	0.268	0.202
			CT	37(31.62)	185(47.56)				
			TT	15(12.82)	33(8.48)				
		DOM	CC	115(97.17)	378(97.17)	0.59	0.38-0.92	0.019	0.019
			CT+TT	2(2.83)	11(2.83)				
			REC	CC+CT	02(87.18)				
TT	15(12.82)	33(11.42)							

rs6567273	G/A	Modelo	RANK		OR	IC95%	valor p	p Perm	
			Genótipo	Caso (%)					
ADD			AA	93 (23.91)	38 (32.48)	0.92	0.67-1.25	0.592	0.52
			AG	205(52.70)	46(39.32)				
			GG	91(23.39)	33(28.21)				
DOM			AA	93(23.91)	38(32.48)	0.61	0.38-0.99	0.047	0.048
			AG+AA	296(76.09)	79(67.52)				
			AA+AG	298(76.61)	84(71.79)				
REC			GG	91(23.39)	33(28.21)	1.33	0.81-2.19	0.254	0.247
			CC	0	0				

Fonte: Dados do estudo.

Nota: A1/A2- alelo polimórfico/alelo selvagem; ADD- modelo aditivo; DOM-modelo dominante; REC- modelo recessivo; OR- *odds ratio*; IC95%- intervalo de confiança- 95%, valor p- significância estatística $p < 0.05$; p Perm- p permutacional

Tabela 6: Associação significativa entre variantes no gene *RANK* e positiva à periodontite por regressão logística ajustada por idade, obesidade, hábito de respirar pela boca, uso de fio dental (pelo menos uma vez ao dia), asma e componente principal de ancestralidade da amostra.

Variante	A1/A2	Modelo	RANK		OR	IC95%	valor p	p Perm	
			Genótipo	Caso (%)					
rs72931589	T/G	ADD	GG	315(80.98)	83(70.94)	1.69	1.09-2.63	0.018	0.023
			GT	68(17.48)	30(25.64)				
			TT	6(1.54)	4(3.42)				
		DOM	GG	315(80.98)	83(70.94)	1.85	1.12-3.07	1.017	1.016
			GT+TT	74(19.02)	34(29.06)				
		REC	GG+GT	383(98.46)	113(96.58)	1.96	0.49-7.88	0.343	0.270
TT	6(1.54)		4(3.42)						
rs72931590	A/G	ADD	GG	315(80.98)	83(70.94)	1.69	1.09-2.63	0.018	0.023
			GA	68(17.48)	30(25.64)				
			AA	6(1.54)	4(3.42)				
		DOM	GG	315(80.98)	83(70.94)	1.85	1.12-3.07	1.017	1016
			GA+AA	74(19.02)	34(29.06)				
		REC	GG+GA	383(98.46)	113(96.58)	1.96	0.49-7.88	0.343	0.270
AA	6(1.54)		4(3.42)						
rs12954058	G/A	ADD	AA	315(80.98)	83(70.94)	1.69	1.09-2.63	0.018	0.023
			AG	68(17.48)	30(25.64)				
			GG	6(1.54)	4(3.42)				
		DOM	AA	315(80.98)	83(70.94)	1.85	1.12-3.07	1.017	1016
			AG+GG	74(19.02)	34(29.06)				
		REC	AA+AG	383(98.46)	113(96.58)	1.96	0.49-7.88	0.343	0.270
GG	6(1.54)		4(3.42)						
rs72931591	G/A	ADD	AA	315(80.98)	83(70.94)	1.69	1.09-2.63	0.018	0.023
			AG	68(17.48)	30(25.64)				
			GG	6(1.54)	4(3.42)				
		DOM	AA	315(80.98)	83(70.94)	1.85	1.12-3.07	1.017	1016
			AG+GG	74(19.02)	34(29.06)				
		REC	AA+AG	383(98.46)	113(96.58)	1.96	0.49-7.88	0.343	0.270
GG	6(1.54)		4(3.42)						

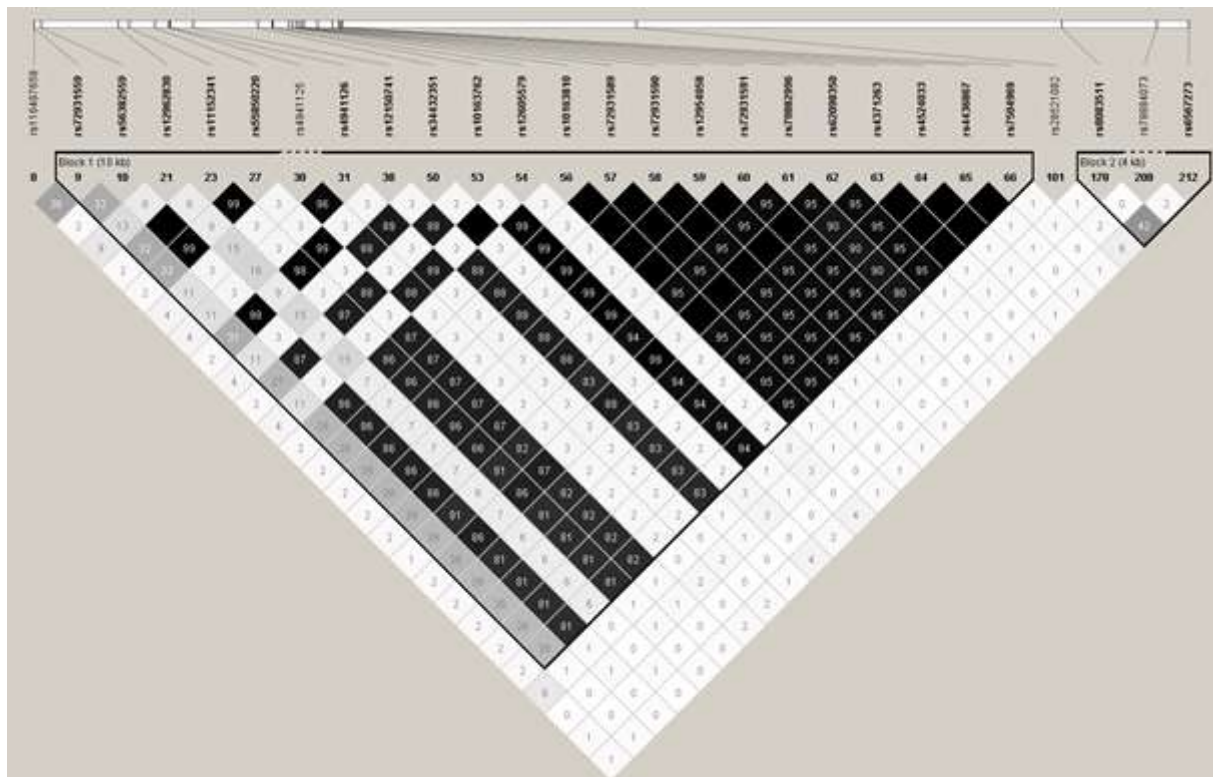
rs62098350	G/A	ADD	AA	315(80.98)	83(70.94)	1.69	1.09-2.63	0.018	0.023
			AG	68(17.48)	30(25.64)				
			GG	6(1.54)	4(3.42)				
		DOM	AA	315(80.98)	83(70.94)	1.85	1.12-3.07	1.017	1.016
			AG+GG	74(19.02)	34(29.06)				
			AA+AG	383(98.46)	113(96.58)				
REC	GG	6(1.54)	4(3.42)	1.96	0.49-7.88	0.343	0.270		
	CC	315(80.98)	83(70.94)						
	CT	68(17.48)	30(25.64)						
rs10163810	T/C	ADD	TT	6(1.54)	4(3.42)	1.69	1.09-2.63	0.018	0.023
			CC	315(80.98)	83(70.94)				
			CT+TT	74(19.02)	34(29.06)				
		DOM	CC	315(80.98)	83(70.94)	1.85	1.12-3.07	1.017	1.016
			CT+TT	74(19.02)	34(29.06)				
			CC+CT	383(98.46)	113(96.58)				
REC	TT	6(1.54)	4(3.42)	1.96	0.49-7.88	0.343	0.270		
	CC	318(81.75)	83(70.94)						
	CT	66(16.97)	31(26.50)						
rs79882996	T/C	ADD	TT	5(1.28)	3(2.56)	1.77	1.13-2.79	0.013	0.018
			CC	318(81.75)	83(70.94)				
			CT+TT	71(18.25)	34(29.06)				
		DOM	CC	318(81.75)	83(70.94)	1.97	1.19-3.28	0.009	0.010
			CT+TT	71(18.25)	34(29.06)				
			CC+CT	384(98.72)	114(97.44)				
REC	TT	5(1.28)	3(2.56)	1.61	0.34-7.74	0.550	0.778		
	AA	316(81.23)	85(72.65)						
	AG	67(17.22)	28(23.93)						
rs4371263	G/A	ADD	GG	6(1.55)	4(3.42)	1.58	1.01-2.45	0.044	0.066
			GA	67(17.22)	28(23.93)				
			AA	6(1.55)	4(3.42)				
		DOM	GG	316(81.23)	85(72.65)	1.68	1.01-2.81	0.046	0.037
			GA+AA	73(18.77)	32(27.35)				
			AA+AG	383(98.46)	113(96.58)				
REC	GG	6(1.54)	4(3.42)	1.96	0.49-7.87	0.343	0.270		
	GG	316(81.23)	85(72.65)						
	GA	67(17.22)	28(23.93)						
rs4524033	A/G	ADD	AA	6(1.55)	4(3.42)	1.58	1.01-2.45	0.044	0.066
			GA	67(17.22)	28(23.93)				
			AA	6(1.55)	4(3.42)				
		DOM	GG	316(81.23)	85(72.65)	1.68	1.01-2.81	0.046	0.037
			GA+AA	73(18.77)	32(27.35)				
			GG+GA	383(98.46)	113(96.58)				
REC	AA	6(1.54)	4(3.42)	1.96	0.49-7.87	0.343	0.270		
	CC	316(81.23)	85(72.65)						
	CA	67(17.22)	28(23.93)						
rs4436867	A/C	ADD	AA	6(1.55)	4(3.42)	1.58	1.01-2.45	0.044	0.066
			CA	67(17.22)	28(23.93)				
			AA	6(1.55)	4(3.42)				
		DOM	CC	316(81.23)	85(72.65)	1.68	1.01-2.81	0.046	0.037
			CA+AA	73(18.77)	32(27.35)				
			CC+CA	383(98.46)	113(96.58)				
REC	A	6(1.54)	4(3.42)	1.96	0.49-7.87	0.343	0.270		
	GG	316(81.23)	85(72.65)						
	GA	67(17.22)	28(23.93)						
rs7504969	A/G	ADD	AA	6(1.55)	4(3.42)	1.58	1.01-2.45	0.044	0.066
			GA	67(17.22)	28(23.93)				
			AA	6(1.55)	4(3.42)				
		DOM	GG	316(81.23)	85(72.65)	1.68	1.01-2.81	0.046	0.037
			GA+AA	73(18.77)	32(27.35)				
			GG+GA	383(98.46)	113(96.58)				
REC	AA	6(1.54)	4(3.42)	1.96	0.49-7.87	0.343	0.270		
	CC	316(81.23)	85(72.65)						
	CA	67(17.22)	28(23.93)						

rs10163762	T/G	ADD	GG	316(81.23)	83(70.94)	1.70	1.10-2.63	0.018	0.023
			GT	67(17.22)	30(25.64)				
			TT	6(1.56)	4(3.42)				
		DOM	GG	316(81.23)	83(70.94)	1.86	1.12-3.08	0.016	0.019
			GT+TT	73(18.77)	34(29.06)				
			GG+GT	383(98.46)	113(96.58)				
REC	TT	6(1.54)	4(3.42)	1.96	0.49-7.88	0.342	0.270		
rs12150741	C/T	ADD	TT	314(80.72)	82(70.09)	1.68	1.09-2.58	0.018	0.021
			TC	68(17.48)	31(26.49)				
			CC	7(1.80)	4(3.42)				
		DOM	TT	314(80.72)	82(70.09)	1.89	1.14-3.12	0.013	0.013
			TC+CC	75(19.28)	35(29.91)				
			TT+TC	382(98.20)	113(96.58)				
REC	CC	7(1.80)	4(3.42)	1.68	0.44-6.39	0.450	0.484		
rs11152341	G/A	ADD	AA	313(80.46)	82(70.09)	1.61	1.05-2.46	0.028	0.034
			AG	68(17.48)	31(26.50)				
			GG	8(2.06)	4(3.42)				
		DOM	AA	313(80.67)	82(70.09)	1.88	1.14-3.11	0.014	0.013
			AG+GG	75(19.33)	35(29.91)				
			AA+AG	381(97.94)	113(96.58)				
REC	GG	8(2.06)	4(3.42)	1.27	0.34-4.71	0.723	0.692		
rs56382559	G/A	ADD	AA	313(80.46)	82(70.09)	1.61	1.05-2.46	0.028	0.034
			AG	68(17.48)	31(26.50)				
			GG	8(2.06)	4(3.42)				
		DOM	AA	313(80.67)	82(70.09)	1.88	1.14-3.11	0.014	0.013
			AG+GG	75(19.33)	35(29.91)				
			AA+AG	381(97.94)	113(96.58)				
REC	GG	8(2.06)	4(3.42)	1.27	0.34-4.71	0.723	0.692		
rs55850220	A/G	ADD	GG	314(80.72)	82(70.09)	1.61	1.05-2.47	0.028	0.030
			GA	67(17.22)	31(26.50)				
			AA	8(2.06)	4(3.42)				
		DOM	GG	314(80.72)	82(70.09)	1.89	1.14-3.12	0.013	0.013
			GA+AA	75(19.28)	35(29.91)				
			GG+GA	381(97.94)	113(96.58)				
REC	AA	8(2.06)	4(3.42)	1.27	0.34-4.71	0.723	0.692		
rs28521082	A/G	ADD	GG	317(81.49)	87(74.36)	1.57	0.99-2.52	0.056	0.066
			GA	67(17.22)	27(23.08)				
			AA	5(1.29)	3(2.56)				
		DOM	GG	317(81.49)	87(74.36)	1.70	1.00-2.88	0.049	0.047
			GA+AA	72(18.51)	30(25.64)				
			GG+GA	384(98.71)	114(97.44)				
REC	AA	5(1.29)	3(2.56)	1.67	0.34-8.25	0.530	0.857		
rs116487658	T/C	ADD	CC	305(78.41)	80(68.38)	1.60	1.07-2.41	0.023	0.022
			CT	75(19.28)	32(27.35)				
			TT	9(2.31)	5(4.27)				
		DOM	CC	305(78.41)	80(68.38)	1.78	1.09-2.91	0.020	0.021
			CT+TT	84(21.59)	37(31.62)				
			CC+CT	380(97.69)	112(95.73)				
REC	TT	9(2.31)	5(4.27)	1.77	0.54-5.85	0.348	0.36		

rs72931559	T/C	ADD	CC	209(53.73)	42(35.90)	1.75	1.26-2.42	0.001	0.001
			CT	149(38.30)	58(49.57)				
			TT	31(7.97)	17(15.53)				
		DOM	CC	209(53.73)	42(35.90)	2.16	1.37-3.40	0.001	0.001
			CT+TT	180(46.27)	75(64.10)				
			REC	CC+CT	358(92.03)				
TT	31(7.97)	17(15.53)							
rs79884073	C/T	ADD	TT	377(96.92)	106(90.60)	4.27	1.70-10.75	0.002	0.002
			TC	12(3.08)	11(9.40)				
			CC	0	0				
		DOM	TT	377(96.92)	106(90.6)	4.27	1.70-10.75	0.002	0.002
			TC+CC	12(3.08)	11(9.40)				
			REC	TT+TC	389(100.0)				
			CC	0	0				

Nota: A1/A2- alelo polimórfico/alelo selvagem; ADD- modelo aditivo; DOM-modelo dominante; REC- modelo recessivo; OR- *odds ratio*; IC95%- intervalo de confiança- 95%, valor p- significância estatística $p < 0.05$; p Perm- p permutacional

Figura 1: Análise do desequilíbrio de ligação (DL) realizada no programa Haploview usando o R^2 para os SNV associados no gene *RANK*. A intensidade da cor e o valor no quadrado indicam o grau de confiança no valor de R^2 e o quanto os SNV estão em desequilíbrio de ligação.



Fonte: Dados do estudo.

Gene RANKL x Periodontite

Para o gene *RANKL*, 10 SNV têm função intrônica e 1, função “utr prime” e a frequência do menor alelo na população estudada variou entre 1,7% e 19% (**Tabela 7**).

Todos as variantes genéticas encontrados no gene *RANKL* tiveram seu menor alelo associado positivamente à periodontite. (**Tabela 8**). Os SNV rs77458205 (alelo A), rs1735535 (menor alelo T), rs115675044 (alelo T), rs7999048 (alelo A), rs79005806 (alelo C) e rs34886516 (alelo A) foram significativamente associados nos modelos aditivo e dominante (OR 3,10 IC95% 1.08-8.91) e estão em perfeito LD ($r^2=1,0$) (Figura 2). Os rs6561061 (alelo A), rs1022926 (alelo C), rs1022927 (alelo C), rs9525645 (alelo G) foram associados no modelo recessivo (OR 3,05 IC95% 1.13-8.20). Os rs1022926, rs1022927 e rs9525645 estão em perfeito LD ($r^2=1,0$) e o rs6561061 está em alta correlação com estes ($r^2=0,98$) (Figura 2). O rs443188 teve seu alelo A associado nos modelos aditivo e dominante (OR 2,43 IC95% 1.03-5.76) e apresentou média correlação com o rs34886516 ($r^2=0,63$) (Figura 2).

Tabela 7: Descrição genética e funcional dos SNV em *RANKL*.

GENE <i>RANKL</i> SNV	MAF	A1	A2	DBSNP	Regulome DB	HWE
rs77458205	0.01779	A	G	íntron	4	1
rs115675044	0.01779	T	A	íntron	3a	1
rs7999048	0.01779	A	G	íntron	4	1
rs79005806	0.01779	C	G	íntron	7	1
rs34886516	0.01779	A	G	utr prime	4	1
rs443188	0.02767	A	G	íntron	3a	1
rs6561061	0.1957	A	G	íntron	4	0.6714
rs1022926	0.1976	C	G	íntron	4	0.7789
rs1022927	0.1976	C	T	íntron	4	0.7789
rs9525645	0.1976	G	A	íntron	6	0.7789
rs61735535	0.01779	T	C	íntron	4	0.7789

Fonte: Dados do estudo:

Legenda: SNV: variante de nucleotídeo único. MAF: frequência de menor alelo. A1: menor alelo. A2: alelo ancestral. DBSNP: função no DBSNP. Predição para SNV do Regulome DB. HWE: equilíbrio de Hardy Weinberg.

Tabela 8: Associação significativa entre variantes no gene *RANKL* e positiva à periodontite por regressão logística ajustado por idade, obesidade, hábito de respirar pela boca, uso de fio dental (pelo menos uma vez ao dia), asma e componente principal de ancestralidade da amostra.

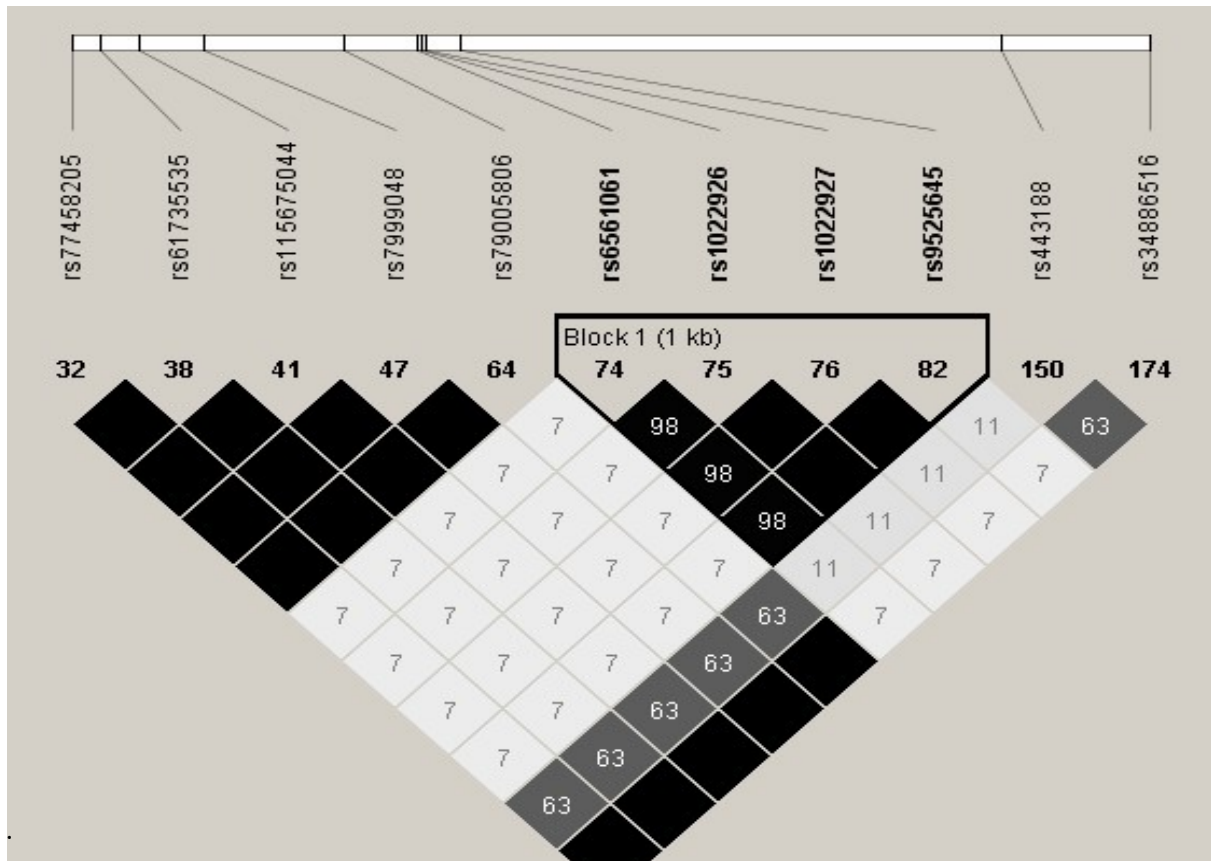
<i>RANKL</i>									
Variante	A1/A2	Modelo	Genótipo	Controle (%)	Caso (%)	OR	IC95%	valor p	p Perm
rs77458205	A/G	ADD	GG	379(97.42)	109(93.16)	3.10	1.08-8.91	0.035	0.022
			GA	10(2.58)	8(6.84)				
			AA	0	0				
		DOM	GG	379(97.42)	109(93.16)	3.10	1.08-8.91	0.035	0.019
			GA+AA	10(2.58)	8(6.84)				
			REC	GG+GA	389(100.0)				
rs61735535	T/C	ADD	CC	379(97.42)	109(93.16)	3.10	1.08-8.91	0.035	0.022
			CT	10(2.58)	8(6.84)				
			TT	0	0				
		DOM	CC	379(97.42)	109(93.16)	3.10	1.08-8.91	0.035	0.019
			CT+TT	10(2.58)	8(6.84)				
			REC	CC+CT	389(100.0)				
rs115675044	T/A	ADD	AA	379(97.42)	109(93.16)	3.10	1.08-8.91	0.035	0.022
			AT	10(2.58)	8(6.84)				
			TT	0	0				
		DOM	AA	379(97.42)	109(93.16)	3.10	1.08-8.91	0.035	0.019
			AT+TT	10(2.58)	8(6.84)				
			REC	AA+AT	389(100.0)				
rs7999048	A/G	ADD	GG	379(97.42)	109(93.16)	3.10	1.08-8.91	0.035	0.022
			GA	10(2.58)	8(6.84)				
			AA	0	0				
		DOM	GG	379(97.42)	109(93.16)	3.10	1.08-8.91	0.035	0.019
			GA+AA	10(2.58)	8(6.84)				
			REC	GG+GA	389(100.0)				
rs79005806	C/G	ADD	GG	379(97.42)	109(93.16)	3.10	1.08-8.91	0.035	0.022
			GT	10(2.58)	8(6.84)				
			TT	0	0				
		DOM	GG	379(97.42)	109(93.16)	3.10	1.08-8.91	0.035	0.019
			GT+TT	10(2.58)	8(6.84)				
			REC	GG+GT	389(100.0)				
			TT	0	0				

rs34886516	A/G	ADD	GG	379(97.42)	109(93.16)	3.10	1.08-8.91	0.035	0.022
			GA	10(2.58)	8(6.84)				
			AA	0	0				
		DOM	GG	379(97.42)	109(93.16)	3.10	1.08-8.91	0.035	0.019
			GA+AA	10(2.58)	8(6.84)				
		REC	GG+GA	389(100.0)	117(100.0)	-	-	-	-
		AA	0	0					
rs443188	A/G	ADD	GG	372(95.62)	106(90.59)	2.43	1.03-5.76	0.043	0.028
			GA	17(4.38)	11(9.41)				
			AA	0	0				
		DOM	GG	372(95.62)	106(90.59)	2.43	1.03-5.76	0.043	0.038
			GA+AA	17(4.38)	11(9.41)				
		REC	GG+GA	389(101)	117(101)	-	-	-	-
		AA	0	0					
rs6561061	A/G	ADD	GG	254(65.30)	75(64.10)	1.26	0.86-1.85	0.234	0.257
			GA	122(31.36)	34(29.06)				
			AA	13(3.34)	8(6.84)				
		DOM	GG	254(65.30)	75(64.10)	1.12	0.71-1.77	0.626	0.727
			GA+AA	135(34.70)	42(35.09)				
		REC	GG+GA	376(96.65)	109(93.16)	3.05	1.13-8.20	0.027	0.014
		AA	13(3.35)	8(6.84)					
rs1022926	C/G	ADD	GG	253(65.03)	74(63.24)	1.23	0.61-1.14	0.563	0.6
			GC	123(31.61)	35(29.91)				
			CC	13(3.34)	8(6.83)				
		DOM	GG	253(65.03)	74(63.24)	1.16	0.74-1.83	0.516	0.6
			GC+CC	136(34.97)	43(36.76)				
		REC	GG+GC	376(96.65)	109(93.16)	3.05	1.13-8.20	0.027	0.014
		CC	13(3.35)	8(6.84)					
rs1022927	C/T	ADD	TT	253(65.03)	74(63.24)	1.29	0.88-1.89	0.184	0.189
			TC	123(31.61)	35(29.91)				
			CC	13(3.34)	8(6.83)				
		DOM	TT	253(65.03)	74(63.24)	1.16	0.74-1.83	0.516	0.6
			TC+CC	136(34.97)	43(36.76)				
		REC	TT+TC	376(96.65)	109(93.16)	3.05	1.13-8.20	0.027	0.014
		CC	13(3.35)	8(6.84)					
rs9525645	G/A	ADD	AA	253(65.03)	74(63.24)	1.29	0.88-1.89	0.184	0.189
			AG	123(31.61)	35(29.91)				
			GG	13(3.34)	8(6.83)				
		DOM	AA	253(65.03)	74(63.24)	1.16	0.74-1.83	0.516	0.6
			AG+GG	136(34.97)	43(36.76)				
		REC	AA+AG	376(96.65)	109(93.16)	3.05	1.13-8.20	0.027	0.014
		GG	13(3.35)	8(6.84)					

Fonte: Dados do estudo.

Nota: A1/A2- alelo polimórfico/alelo selvagem; ADD- modelo aditivo; DOM-modelo dominante; REC- modelo recessivo; OR- *odds ratio*; IC95%- intervalo de confiança- 95%, valor p- significância estatística $p < 0.05$; p Perm- p permutacional.

Figura 2: Análise do desequilíbrio de ligação (DL) realizada no programa Haploview usando o R^2 para os SNV associados no gene *RANKL*. A intensidade da cor e o valor no quadrado indicam o grau de confiança no valor de R^2 e o quanto os SNV estão em desequilíbrio de ligação



Fonte: Dados do estudo.

Gene OPG x Periodontite

Os dois SNV que apresentaram associação no gene *OPG* têm função intrônica e frequência de menor alelo de 32,5% na população do estudo (**Tabela 9**). O rs7010267 (alelo A) e o rs1982763 (alelo T) foram associados positivamente à periodontite no modelo recessivo (OR 1.97 IC95% 1.02-3.82) (**Tabela 10**), e tiveram alta correlação entre si ($r^2=0,99$) (Figura 3).

Tabela 9: Descrição genética e funcional dos SNV em *OPG*.

GENE <i>OPG</i> SNV	MAF	A1	A2	DBSNP	Regulome DB score	HWE
rs7010267	0.325	A	C	íntron	7	0.840
rs1982763	0.325	T	C	íntron	5	0.919

Fonte: Dados do estudo

SNV: variante de nucleotídeo único. MAF: frequência de menor alelo. A1: menor alelo. A2: alelo ancestral. DBSNP: função no DBSNP. Predição para SNV do Regulome DB. HWE: equilíbrio de Hardy Weinberg.

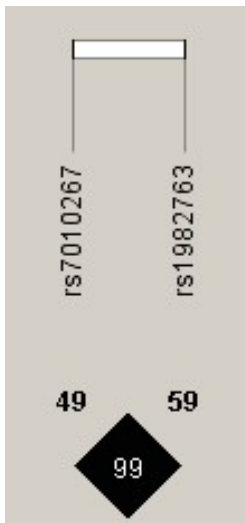
Tabela 10: Associação significativa entre variantes no gene *OPG* e positiva à periodontite por regressão logística ajustado por idade, obesidade, hábito de respirar pela boca, uso de fio dental (pelo menos uma vez ao dia), asma e componente principal de ancestralidade da amostra.

SNV	A1/A2	Modelo	Genótipo	<i>OPG</i>		OR	IC95%	valor p	p Perm
				Controle (%)	Caso (%)				
rs7010267	A/C	ADD	CC	174(44.73)	55(47.01)	1.07	0.77- 1.49	0.699	1
			CA	181(46.53)	44(37.61)				
			AA	34(8.74)	18(15.38)				
		DOM	CC	174(44.73)	55(47.01)	0.85	0.55- 1.32	0.462	1
			CA+AA	215(55.27)	62(52.99)				
		REC	CC+CA	355(91.26)	99(84.62)	1.97	1.02- 3.82	0.044	0.043
AA	34(8.74)		18(15.38)						
rs1982763	T/C	ADD	CC	176(45.24)	55(47.01)	1.08	0.77- 1.50	0.655	1
			CT	179(46.02)	44(37.61)				
			TT	34(8.74)	18(15.38)				
		DOM	CC	176(45.24)	55(47.01)	0.86	0.56- 1.34	0.511	1
			CT+TT	213(54.76)	62(52.99)				
		REC	CC+CT	355(91.26)	99(84.62)	1.97	1.02- 3.82	0.044	
TT	34(8.74)		18(15.38)						

Fonte: Dados do estudo

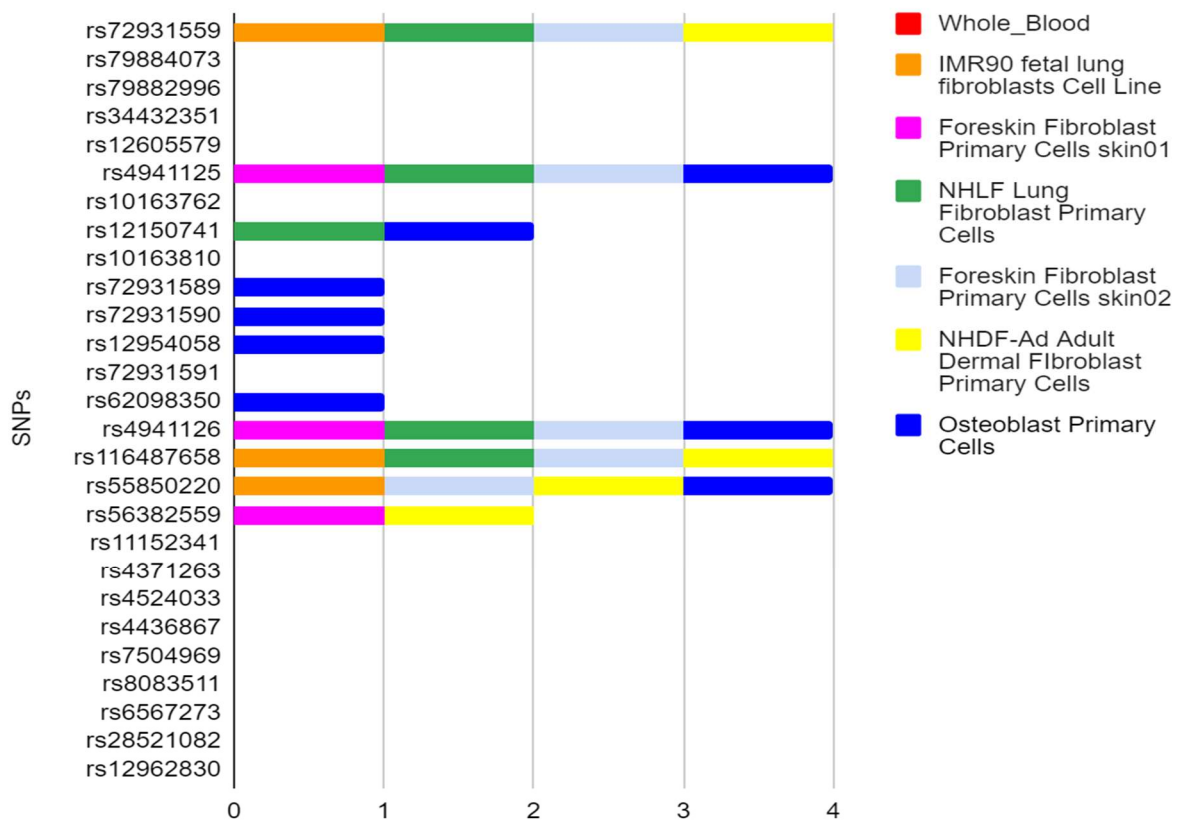
Nota: A1/A2- alelo polimórfico/alelo selvagem; ADD- modelo aditivo; DOM-modelo dominante; REC- modelo recessivo; OR- *odds ratio*; IC95%- intervalo de confiança- 95%, valor p- significância estatística $p < 0.05$; p Perm- p permutacional.

Figura 3: Análise do desequilíbrio de ligação (DL) realizada no programa Haploview usando o R^2 para os SNV associados no gene *OPG*. A intensidade da cor e o valor no quadrado indicam o grau de confiança no valor de R^2 e o quanto os SNV estão em desequilíbrio de ligação.



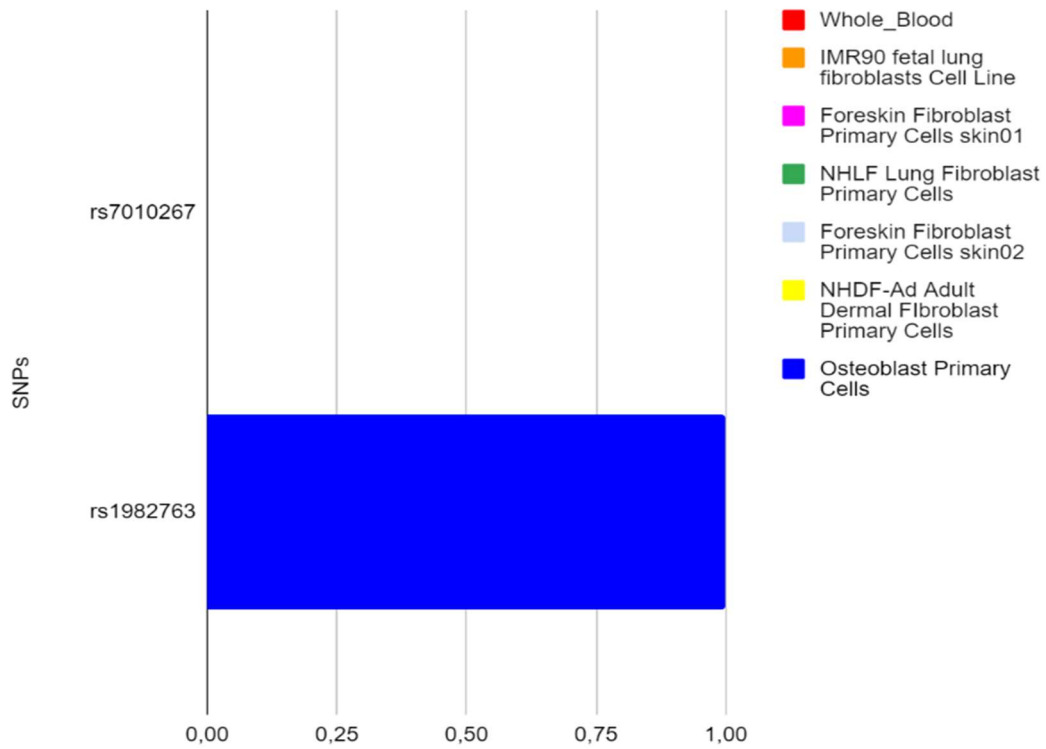
Fonte: Dados do estudo.

Figura 4: Análise *in silico* da expressão dos SNV de *RANK* no sangue total, em alguns tipos de tecidos com fibroblastos e em células osteoblásticas primárias realizada no programa HaploReg 4.1.



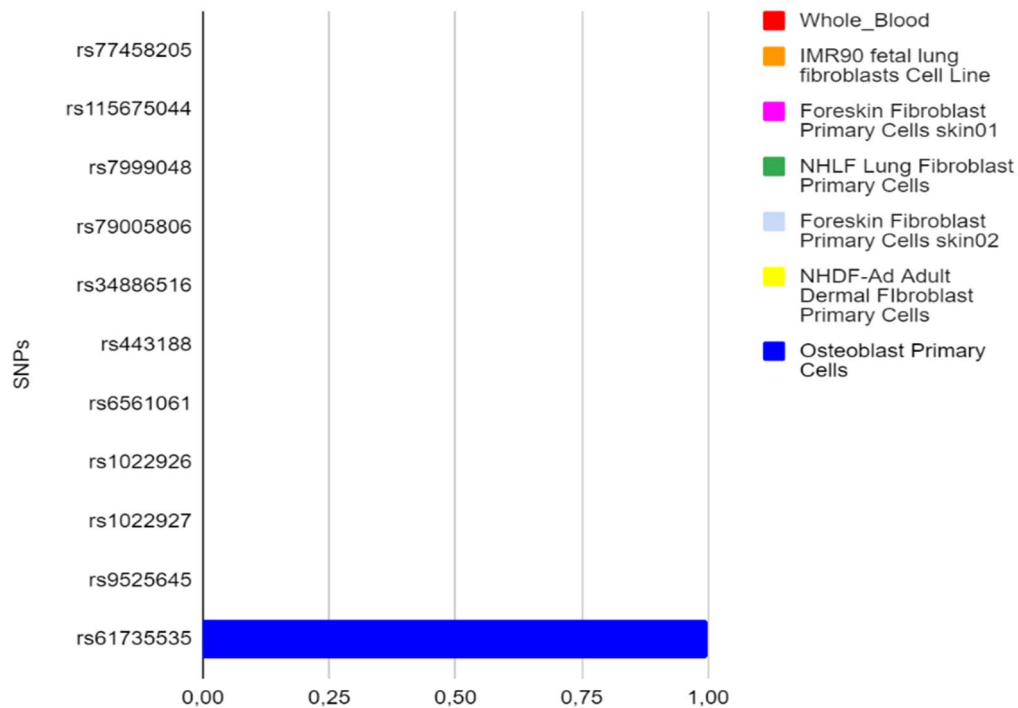
Fonte: Dados do estudo.

Figura 5: Análise *in silico* da expressão dos SNV de *RANKL* no sangue total, em alguns tipos de tecidos com fibroblastos e em células osteoblásticas primárias realizadas no programa HaploReg 4.1.



Fonte: Dados do estudo.

Figura 6: Análise *in silico* da expressão dos SNV de *OPG* no sangue total, em alguns tipos de tecidos com fibroblastos e em células osteoblásticas primárias realizada no programa HaploReg 4.1.



Fonte: Dados do estudo.

Análise funcional in silico de variantes genéticas nos genes RANK, RANKL e OPG na população caso e controle

As pontuações das variantes genéticas na plataforma RegulomeDB são apresentadas nas **Tabelas 4, 7 e 9**. As pontuações mais baixas, no gene *RANK*, foram 1f (rs4941125), 2b (rs55850220) e 3a (rs34432351, rs72931591); e no gene *RANKL* foi 3a (rs115675044 e rs443188) e indicam as possíveis variantes que podem estar envolvidas em regiões reguladoras e funcionais. Já os valores mais altos de 4 a 6 assumem que as variantes não estão diretamente envolvidas nos processos funcionais. Não há informação disponível sobre a pontuação 7.

A investigação da presença desses SNV em tecidos como sangue total, fibroblastos de pulmão fetal, células primárias de fibroblasto de prepúcio, células primárias de fibroblasto pulmonar, células primárias de fibroblasto de derme de adulto e células osteoblásticas primárias foram ilustradas nas Figuras 4, 5 e 6. Como os bancos de dados disponíveis não dispõem da

genotipagem do tecido periodontal, utilizaram-se tecidos similares contendo fibroblastos para a análise.

Para *RANK*, o rs72931559 e o rs116487658 foram identificados em quatro tecidos com fibroblastos. Os rs4941125, rs4941126 e rs55850220 foram identificados em três tecidos contendo fibroblastos e em células osteoblásticas primárias. O rs56382559 apareceu em dois tecidos com fibroblastos e o rs12150741 foi identificado em um tecido com fibroblastos e em células osteoblásticas primárias. Os rs72931589, rs72931590, rs12954058, rs62098350 foram identificados somente em células osteoblásticas primárias e os demais SNV não foram identificados nesses tecidos selecionados (Figura 4).

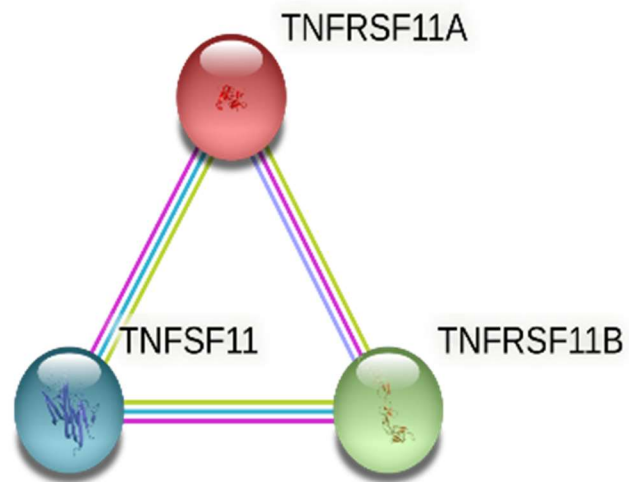
Em *RANKL*, o rs61735535 (Figura 5) e em *OPG*, o rs1982763 (Figura 6) foram identificados em células osteoblásticas primárias. Os demais SNV destes genes não foram encontrados nestes tecidos selecionados.

Interação funcional entre os genes RANK, RANKL e OPG

Os genes *RANK* (*TNFRSF11A*), *RANKL* (*TNFRSF11*) e *OPG* (*TNFRSF11B*) têm três tipos de interação (Figura 7) e elas estão previstas em bancos de dados com curadoria, foram determinadas experimentalmente e partem de buscas textuais.

Essa figura mostra a grande interação entre esses genes. Na inflamação, a ação das citocinas inflamatórias estimula os macrófagos ativados, que são os precursores dos osteoclastos e que possuem o receptor de superfície *TNFRSF11A* (*RANK*) a ligarem-se com seu ligante *TNFRSF11* (*RANKL*) fazendo com que os pré-osteoclastos se transformem em osteoclastos ativos que produzem enzimas que irão reabsorver o osso. *TNFRSF11B* (*OPG*) age por inibição competitiva com *RANKL*, e liga-se a *RANK*, impedindo a ativação dos osteoclastos.

Figura 7: Análise da rede de interação funcional de proteínas codificadas pelos genes candidatos *RANK*, *RANKL* e *OPG* à periodontite, usando STRING v10.0, considerando cada proteína como um nó. Cor do nó: nós coloridos- proteínas de consulta e primeira camada de interatores. Conteúdo do nó: nós preenchidos- alguma estrutura 3D é conhecida ou prevista. A cor da linha indica o tipo de evidência de interação entre os genes- interações conhecidas: azul- interações de bancos de dados com curadoria; roxo- interações determinadas experimentalmente; verde claro- mineração de texto.



Fonte: Dados do estudo

Discussão

Os genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* apresentam grande interação entre eles, estando envolvidos na dinâmica do metabolismo ósseo e na reabsorção óssea que ocorre na periodontite. Este estudo foi o primeiro a demonstrar que a presença da periodontite, uma doença multifatorial com envolvimento de processos inflamatórios e distúrbios relacionados ao metabolismo ósseo, foi associada significativamente a variantes genéticas dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG*, sendo 36 SNV associados positivamente e 4 negativamente.

Nesta investigação sete variantes no gene *RANK* foram associadas negativamente à doença periodontal: rs12605579 (alelo A), rs34432351 (alelo A), rs4941125 (alelo G), rs4941126 (alelo C), rs12962830 (alelo A), rs8083511 (alelo C) e rs6567273 (alelo A). Já outros 20 SNV no gene *RANK* foram associados positivamente à periodontite. Os rs4941125 (alelo G) e rs4941126 (alelo C), os quais têm alta correlação entre si, estão associados negativamente à doença periodontal. Na nossa população, estes alelos apresentaram frequência de 21% e 22%, respectivamente. Em estudo que envolveu 4.102 indivíduos caucasianos, o alelo G do rs4941125 também foi associado a quatro fenótipos relacionados à obesidade. Os autores investigaram a relação da obesidade, doença inflamatória e o gene *RANK*, já que este, além de estar relacionado ao metabolismo ósseo e a osteoporose, também tem relação com os músculos esqueléticos, essenciais para o metabolismo energético (95). A influência do rs4941125 na idade da menarca e da menopausa natural também foi estudada em várias plataformas *in silico* no estudo de 2021 de Dvornyck (101), onde o autor encontrou que essa variante influencia a expressão dos genes *RELCH* e *KIAA1468* (efeito cis-eQTL) no sangue periférico, além de se apresentar com maior expressão nos tecidos de mucosa do esôfago, pele e tireoide. Uma das maneiras possíveis pelas quais *RANK* pode afetar a idade da menarca e da menopausa seria através do seu envolvimento no metabolismo de lipídios, visto que a relação entre obesidade e idade da menarca já está bem estabelecida. No estado de inflamação que ocorre na obesidade, o eixo do ácido araquidônico e das prostaglandinas E2 está envolvido na morte de células do epitélio uterino que ocorre na menopausa. Esse fato corrobora o estudo de Zhao e colaboradores de 2016 (95), o qual concluiu que *RANK* poderia ser um fator genético pleiotrópico, que influencia os fenótipos da osteoporose e da obesidade. Sabe-se que na obesidade há um comprometimento do sistema imunológico do indivíduo, pois a quebra da homeostase do tecido adiposo leva a um aumento e maior ativação das células imunes. Várias citocinas e quimiocinas são secretadas no tecido adiposo obeso, desencadeando a sinalização inflamatória. Uma combinação entre obesidade e periodontite amplifica a inflamação em níveis que afetam todo

o corpo por meio do tecido adiposo. Sendo assim, a obesidade poderia estar relacionada à exacerbação da periodontite (102). É importante ressaltar que o rs4941125 tem uma pontuação de 1f no RegulomeDB, o que indica seu provável envolvimento em mecanismos regulatórios e funcionais de *RANK*, atuando negativamente no desenvolvimento da periodontite na população estudada. Além disso, apresentou uma maior expressão em três tipos de tecidos contendo fibroblastos e em células osteoblásticas primárias.

Outro estudo encontrou associação do alelo A do rs4941125 com a doença óssea de Paget, relacionada com um distúrbio do metabolismo ósseo, e associação do haplótipo AAC dos rs4941125, rs9962159, rs10163810 no teste de multimarcadores para essa doença (103). Este último SNV (rs10163810), no presente estudo foi associado positivamente à doença periodontal, com uma frequência do menor alelo T de 12% na nossa população. O rs4941125, que tem um provável potencial regulador e funcional, apresentou também alta correlação com dois outros SNV, o rs34432351(alelo A) e o rs12605579 (alelo A), relacionados negativamente à doença periodontal, com a frequência do menor alelo de 20% na nossa população e que são herdados juntos, sendo que o rs34432351 mostra também um possível potencial regulatório e funcional, com score 3a na plataforma RegulomeDB.

Outro SNV do gene *RANK*, o rs8083511 (alelo T) que se mostrou associado negativamente à doença periodontal, tendo uma frequência de 31% na nossa população, também foi relacionado no estudo de Zheng e colaboradores (7), como fator de proteção genética, no haplótipo CACG, em relação à densidade mineral óssea da região de L1 a L4 da coluna lombar de mulheres chinesas pós-menopáusicas, com osteoporose ou osteopenia, que receberam alendronato (70 mg semanais) por via oral durante um ano. Também em relação à densidade mineral óssea, o alelo C do rs8083511 mostrou associação com o fenótipo da área da seção transversal do rádio distal de homens europeus, verificada através de tomografia computadorizada quantitativa periférica (*pQCT*) (87). Um estudo sobre Doença de Paget encontrou associação significativa do alelo A deste SNV com a doença (103). O alelo C deste SNV também foi associado à susceptibilidade ao vitiligo, doença autoimune, em indivíduos de ascendência europeia. Essa susceptibilidade é explicada pelo fato de a ligação *RANK-RANKL* regular variados aspectos funcionais das células imunes, incluindo interações de células T e células dendríticas. A patogênese do vitiligo envolve uma rede complexa de proteínas imunorreguladoras, reguladores apoptóticos e componentes de melanócitos que vão intermediar o aspecto autoimune dos melanócitos nessa enfermidade (104).

Em relação à associação positiva com a periodontite, encontramos 20 SNV em *RANK*. O rs4524033, que tem seu menor alelo A com frequência de 11% na nossa população, foi descrito em um estudo de caso-controle com 758 indivíduos caucasianos, dentre os quais 315 sofreram osteólise, a principal causa de falha da artroplastia total do quadril. Este SNV teve seu alelo A associado à maior susceptibilidade à osteólise (105). Adicionalmente, na nossa população este rs4524033 (alelo A) mostra alta correlação, entre 95% e 100% com os rs4371263 (alelo G), rs4436867 (alelo A), rs7504969 (alelo A), rs10163810 (alelo T), rs72931590 (alelo A), rs72931589 (alelo T), rs12954058 (alelo G), rs72931591 (alelo G), rs62098350 (alelo G), o que significa que provavelmente estes SNV são herdados em conjunto. Em relação à funcionalidade, o rs4371263 (alelo G) e o rs72931591 (alelo G) mostraram probabilidade de potencial regulatório e funcional, devido à pontuação 3a na plataforma RegulomeDB. Além disso, o rs55850220 (alelo A), que também obteve pontuação 3a, tem alta correlação com esse bloco de SNV, variando entre 82% e 87%. Alguns desses SNV foram encontrados em tecidos com fibroblastos e/ou em osteoblastos primários: rs55850220 (alelo A), rs72931589 (alelo T), rs72931590 (alelo A), rs12954058 (alelo G) e rs62098350 (alelo G) (Figura 4). As células precursoras dos osteoblastos proliferam em resposta a citocinas. Osteoblastos maduros ficam embutidos na matriz óssea e se transformam em osteócitos. Osteócitos agem orquestrando osteoclastos e osteoblastos (28,30,31,32) e a ligação *RANK-RANKL* induz a diferenciação de osteoclastos, que reabsorvem a matriz óssea (4,36). Poderíamos pensar que as variantes citadas anteriormente - e que foram mais expressas nas células osteoblásticas primárias (que depois se diferenciarão em osteócitos) - podem influenciar na maior expressão de *RANK*; e quando houver um quadro inflamatório, como na periodontite onde há também um aumento de *RANKL*, acontecerá maior proporção da ligação *RANK-RANKL*, ativando assim os pré-osteoclastos em osteoclastos maduros, que reabsorverão a matriz óssea, o que corrobora para o fato dessas variantes terem sido associadas positivamente à periodontite.

Não foram encontradas variantes deste estudo em cultura de fibroblastos do ligamento periodontal ou gengiva, pois os bancos utilizados não tinham a genotipagem desses tecidos. Porém, pudemos extrapolar no seguinte sentido: assim como estas variantes foram encontradas em fibroblastos de pulmão, prepúcio e derme, existe a possibilidade de serem identificadas em fibroblastos gengivais ou do ligamento periodontal em análises futuras. Na artrite reumatoide, por exemplo, os fibroblastos sinoviais, ao serem ativados com citocinas pró-inflamatórias,

como a IL-17, expressam RANKL e aumentam a osteoclastogênese. E na periodontite, RANKL é fornecido principalmente por células ligamento periodontal e osteoblastos (4).

O presente trabalho foi o primeiro a associar à periodontite as variantes estudadas em *RANKL*, onde 11 SNV foram associados positivamente, estando 6 em perfeito equilíbrio ($r^2=1,0$) e 4 em alta correlação, variando de 96% a 100%. Em *OPG*, 2 SNV também foram associados positivamente à doença, estando em alto desequilíbrio de ligação ($r^2=0.99$).

Em *RANKL*, o rs61735535 (alelo T), e em *OPG*, o rs1982763 (alelo T), foram identificados em células osteoblásticas primárias. Os demais SNV desses genes não foram encontrados nesses tecidos selecionados. *RANKL* está entre os reguladores mais importantes produzidos pelos osteócitos (30).

Conclusão

Como conclusão, neste estudo foi demonstrado que 40 SNV dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* foram significativamente associados à doença periodontal. Análises funcionais demonstraram que a presença de alelos específicos pode estar relacionada à uma maior expressão de *RANK*, *RANKL* e *OPG* em células envolvidas na patogênese da doença periodontal. Sugere-se que sejam realizados mais estudos a fim de elucidar os mecanismos moleculares subjacentes a essas associações.

7 DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho mostrou a relação entre a periodontite e variantes genéticas nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG*, diretamente relacionados com a reabsorção óssea que ocorre nessa doença. A periodontite é um processo inflamatório crônico de origem infecciosa, onde o desequilíbrio entre osteoclastos e osteoblastos, mediado pela ligação *RANK/RANKL/OPG*, promove a reabsorção do osso, o que muitas vezes leva à perda dental.

RANK é o membro 11A da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral que atua como receptor para TNFSF11 (*RANKL*), essencial para a osteoclastogênese. *RANKL*, por sua vez, é o membro 11 da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral; uma citocina que se liga a TNFRSF11B (*OPG*) e a TNFRSF11A (*RANK*). Responsável pela diferenciação de osteoclastos, aumento da capacidade das células dendríticas de estimular a proliferação de células T ingênuas, importante regulador das interações entre células T e células dendríticas, desempenha um papel na regulação da resposta imune dependente de células T e pode estar envolvido no aumento da reabsorção óssea. Por fim, *OPG* é o membro 11B da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral que atua como receptor chamariz para TNFSF11/*RANKL* e, assim, neutraliza sua função na osteoclastogênese. Além disso, inibe a ativação dos osteoclastos e promove a apoptose dos osteoclastos *in vitro*. A homeostase óssea parece depender da relação local entre TNFSF11 e TNFRSF11B (106).

Num primeiro momento (Artigo I) foi feita a caracterização de todas as variantes em *RANK*, *RANKL* e *OPG* presentes em nosso banco de dados, bem como do potencial regulatório dessas variantes e quais delas foram consideradas como marcadores de ancestralidade. Nove variantes mostraram-se como AIM e estão mais próximas dos padrões africano e europeu de ancestralidade, o que corrobora parcialmente o estudo de Magalhães e colaboradores (13), que mostrou que a ancestralidade africana predominou numa população de Salvador-Bahia. Infelizmente, não encontramos estudos sobre doenças relacionadas às variantes descritas em nossa população para *RANK*, *RANKL* e *OPG*, em populações africanas, mas encontramos nas populações CEU (europeia) e CHB (chineses han-Pequim) que também são ancestrais à população estudada.

Já num segundo momento, e como foco principal desta dissertação, investigamos no Artigo II as variantes genéticas em *RANK*, *RANKL* e *OPG*, associadas à periodontite. Encontramos 7 SNV relacionados negativamente à doença no gene *RANK* e os outros 33 SNV

em *RANK*, *RANKL* e *OPG* tiveram associação positiva com a doença. Esses SNV foram associados a diversas doenças inflamatórias, como obesidade (95), doenças autoimunes, como a vitiligo (103,) e doenças relacionadas com metabolismo ósseo, como a doença de Paget (103).

Vários SNV do gene *RANK* apresentaram provável potencial regulador e funcional, com pontuação variando entre 1f e 3a no RegulomeDB, destacando-se o rs49411125 (alelo G) com escore 1f e rs34432351 (alelo A), com escore 3a, ambos associados negativamente à periodontite e que têm alta correlação entre si e com outros SNV, também associados negativamente à doença, sendo provavelmente herdados juntos. O rs49411125 foi expresso em três tecidos, com fibroblastos e células osteoblásticas primárias. Também foi expresso nesses tecidos, o rs72931591 (alelo G), com score 3a e que está em alta correlação com outros 6 SNV associados positivamente à doença. O rs4371263 (alelo G) também apresentou escore 3a e associação positiva com a periodontite, bem como o rs55850220 (alelo A), associado positivamente e com forte correlação com o rs11152341, pontuação no RegulomeDB de 2b e expresso em três tecidos com fibroblastos em células osteoblásticas primárias.

Em *RANKL* destacam-se o rs115675044 (alelo T) e o rs443188 (alelo A), ambos com pontuação 3a no RegulomeDB; e o rs61735535 (alelo T), com maior expressão em células osteoblásticas primárias. E em *OPG*, o rs61735535 associado positivamente à periodontite foi mais expresso em células osteoblásticas primárias.

Essa maior expressão de vários SNV em tecidos contendo fibroblastos e células osteoblásticas, células diretamente ligadas com *RANKL* e *OPG*, reforça a possibilidade de que essas variantes genéticas influenciam diretamente no processo de reabsorção óssea que ocorre na periodontite através do eixo *RANK/RANKL/OPG*.

8 CONCLUSÃO GERAL

Este estudo identificou diversas variantes genéticas nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* com variadas frequências, associadas a variados desfechos em outras populações e que tiveram seus alelos associados às populações pseudoancestrais da população brasileira como marcadores de ancestralidade. Além disso, 40 variantes nesses genes estão associadas à periodontite. Sugere-se que sejam realizados mais estudos, a fim de elucidar os mecanismos moleculares subjacentes a essas associações.

REFERÊNCIAS

1. Zhao B, Ivashkiv LB. Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(4):234.
2. Liu YCG, Lerner UH, Teng YTA. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000.* 2010; 52(1):163-206.
3. Kajiyama M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MPA, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol.* 2010; 2(1):5532
4. Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen.* 2020;40:2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7006158/>
5. Li Y, Guo Y, Wang Q, Ouyang Y, Cao Y, Jin T et al. Osteoprotegerin polymorphisms are associated with alcohol-induced osteonecrosis of femoral head in Chinese Han population from Henan province. *J Genet.* 2016;95(4):983–9.
6. Abdi S, Bukhari I, Ansari MGA, BinBaz RA, Mohammed AK, Hussain SD et al. Association of polymorphisms in RANK and RANKL genes with osteopenia in Arab postmenopausal women. *Dis Markers.* 2020;2020:1285216.
7. Zheng H, Wang C, He J-W, Fu W-Z, Zhang Z-L. OPG, RANKL, and RANK gene polymorphisms and the bone mineral density response to alendronate therapy in postmenopausal Chinese women with osteoporosis or osteopenia. *Pharmacogenet Genomics.* 2016;26(1):12–9.
8. Panach L, Mifsut D, Tarín JJ, Cano A, García-Pérez MÁ. Replication study of three functional polymorphisms associated with bone mineral density in a cohort of Spanish women. *J Bone Miner Metab.* 2014;32(6):691–8.
9. Zacarias JMV, de Alencar JB, Tsuneto PY, de Souza VH, Silva CO, Visentainer JEL et al. The influence of TLR4, CD14, OPG, and RANKL polymorphisms in periodontitis: A case-control study. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:4029217.
10. Kadkhodazadeh M, Ebadian AR, Gholami GA, Khosravi A, Tabari ZA. Analysis of RANKL gene polymorphism (rs9533156 and rs2277438) in Iranian patients with chronic periodontitis and periimplantitis. *Arch Oral Biol.* 2013;58(5):530–6.
11. Royal CD, Novembre J, Fullerton SM, Goldstein DB, Long JC, Bamshad MJ, et al. Inferring genetic ancestry: opportunities, challenges, and implications. *Am J Hum Genet.* 2010;86(5):661–73.
12. Lima-Costa MF, Rodrigues LC, Barreto ML, Gouveia M, Horta BL, Mambrini J et al. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). *Sci Rep.* 2015.

13. Magalhães da Silva T, Sandhya Rani MR, de Oliveira Costa GN, Figueiredo MA, Melo PS, Nascimento JF et al. The correlation between ancestry and color in two cities of Northeast Brazil with contrasting ethnic compositions. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(7):984–9.
14. Zacarias JMV, Sippert EA, Tsuneto PY, Visentainer JEL, Silva CO, Sell AM. The influence of interleukin 17A and IL17F polymorphisms on chronic periodontitis disease in Brazilian patients. *Mediators of inflammation.* 2015, 2015:1-8.
15. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003; 74 (3):391-401.
16. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17038.
17. Nędzi-Góra M, Kowalski J, Górska R. The immune response in periodontal tissues. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2017;65(5):421–9.
18. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134–44.
19. Amaliya A, Laine ML, Delanghe JR, Loos BG, Van Wijk AJ, Van der Velden U. Java project on periodontal diseases: periodontal bone loss in relation to environmental and systemic conditions. *J Clin Periodontol.* 2015;42(4):325–32.
20. Lourenço TGB, Heller D, Silva-Boghossian CM, Cotton SL, Paster BJ, Colombo APV. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *J Clin Periodontol.* 2014;41(11):1027–36.
21. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2015;69(1):7–17.
22. Deng Z-L, Szafranski SP, Jarek M, Bhujju S, Wagner-Döbler I. Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Sci Rep.* 2017;7(1):3703.
23. Ali J, Pramod K, Tahir MA, Ansari SH. Autoimmune responses in periodontal diseases. *Autoimmun Rev.* 2011;10(7):426–31.
24. Alfakry H, Malle E, Koyani CN, Pussinen PJ, Sorsa T. Neutrophil proteolytic activation cascades: a possible mechanistic link between chronic periodontitis and coronary heart disease. *Innate Immun.* 2016;22(1):85–99.
25. Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2012;23(11):582–90.
26. Tompkins KA. The osteoimmunology of alveolar bone loss. *Connect Tissue Res.* 2016;57(2):69–90.
27. Iqbal J, Yuen T, Sun L, Zaidi M. From the gut to the strut: where inflammation reigns, bone abstains. *J Clin Invest.* 126(6):2045–8.

28. Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M, Negishi-Koga T, Komatsu N, Terashima A et al. Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiological Reviews*. 2017;97(4):1295–349.
29. Sapir-Koren R, Livshits G. Bone mineralization is regulated by signaling cross talk between molecular factors of local and systemic origin: the role of fibroblast growth factor 23. *Biofactors*. 2014;40(6):555–68.
30. Kalajzic I, Matthews BG, Torreggiani E, Harris MA, Divieti Pajevic P, Harris SE. In vitro and in vivo approaches to study osteocyte biology. *Bone*. 2013;54(2):296–306.
31. Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, et al. Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLoS One*. Sep. 22 2015
32. Ikebuchi Y, Aoki S, Honma M, Hayashi M, Sugamori Y, Khan M, et al. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. *Nature*. 2018;561(7722):195–200.
33. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337–42.
34. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):139–46.
35. Malcolm J, Awang RA, Oliver-Bell J, Butcher JP, Campbell L, Adrados Planell A et al. IL-33 Exacerbates Periodontal Disease through Induction of RANKL. *J Dent Res*. 2015;94(7):968–75.
36. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res*. 2015;2015:615486.
37. Kondegowda NG, Fenutria R, Pollack IR, Orthofer M, Garcia-Ocaña A, Penninger JM et al. Osteoprotegerin and Denosumab Stimulate Human Beta Cell Proliferation through Inhibition of the Receptor Activator of NF- κ B Ligand Pathway. *Cell Metab*. 2015;22(1):77–85.
38. Danks L, Komatsu N, Guerrini MM, Sawa S, Armaka M, Kollias G et al. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(6):1187–95.
39. Meednu N, Zhang H, Owen T, Sun W, Wang V, Cistrone C et al. Production of RANKL by Memory B Cells. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(4):805–16.
40. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:503754.
41. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol*. 2012;39(3):239–48.
42. Teodorescu AC, Martu I, Teslaru S, Kappenberg-Nitescu DC, Goriuc A, Luchian I et al. Assessment of salivary levels of RANKL and OPG in aggressive versus chronic periodontitis. *J Immunol Res*. 2019;2019:6195258.

43. Allam E, Draz A, Hassan A, Neamat A, Galal M, Windsor LJ. Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in ligature-induced periodontitis in osteoporotic and non-osteoporotic rats. *J Periodont Res*. 2010;45(1):136–42.
44. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodont Res*. 2003;38(4):380–7.
45. Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010;53:55–69.
46. Gibertoni F, Sommer MEL, Esquisatto MAM, Amaral MEC do, Oliveira CA de, Andrade TAM de, et al. Evolution of Periodontal Disease: Immune Response and RANK/RANKL/OPG System. *Brazilian Dental Journal*. 2017;28(6):679–87.
47. Suchanecka A, Chmielowiec K, Chmielowiec J, Trybek G, Masiak J, Michałowska-Sawczyn M, et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Cigarette Smoking Impact on Oral Health: A Case-Control Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(9).
48. Jiang M, Li Z, Zhu G. The role of autophagy in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis*. 2020;26(2):259–69.
49. Holtzman JS, Atchison KA, Macek MD, Markovic D. Oral Health Literacy and Measures of Periodontal Disease. *J Periodontol*. 2017;88(1):78–88.
50. Lindhe J, Ranney R, Lamster I, Charles A, Chung CP, Denis TF, Kinane, Listgarten KM, ,Schoor HLR, Seymour G, Somerman M. Consensus Report: Chronic Periodontitis. *Annals of Periodontol*. 1999;4(1).
51. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*. 2015;86(5):611–22.
52. Persson GR. Periodontal complications with age. *Periodontol 2000*. 2018;78(1):185–94.
53. Martelli ML, Brandi ML, Martelli M, Nobili P, Medico E, Martelli F. Periodontal disease and women's health. *Curr Med Res Opin*. 2017;33(6):1005–15.
54. Shiau HJ, Reynolds MA. Sex differences in destructive periodontal disease: a systematic review. *J Periodontol*. 2010;81(10):1379–89.
55. Martelli FS, Fanti E, Rosati C, Martelli M, Bacci G, Martelli ML, et al. Long-term efficacy of microbiology-driven periodontal laser-assisted therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(3):423–31.
56. Shiau HJ, Aichelmann-Reidy ME, Reynolds MA. Influence of sex steroids on inflammation and bone metabolism. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):81–94.
57. Suri V, Suri V. Menopause and oral health. *J Midlife Health*. 2014;5(3):115–20.

58. Kim H-N, Jang Y-E, Kim C-B, Kim N-H. Socioeconomic status and self-reported periodontal symptoms in community-dwelling individuals: data from the Korea Community Health Surveys of 2011 and 2013. *Int Dent J*. 2018;68(6):411–9.
59. Ramseier CA, Anerud A, Dulac M, Lulic M, Cullinan MP, Seymour GJ et al. Natural history of periodontitis: Disease progression and tooth loss over 40 years. *J Clin Periodontol*. 2017;44(12):1182–91.
60. Hakeem FF, Sabbah W. Is there socioeconomic inequality in periodontal disease among 6adults with optimal behaviours. *Acta Odontol Scand*. 2019;77(5):400–7.
61. Nociti FH, Casati MZ, Duarte PM. Current perspective of the impact of smoking on the progression and treatment of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015;67(1):187–210.
62. Nascimento GG, Leite FR, Correa MB, Horta BL, Peres MA, Demarco FF. Relationship between periodontal disease and obesity: the role of life-course events. *Braz Dent J*. 2014;25(2):87–9.
63. Martinez-Herrera M, Silvestre-Rangil J, Silvestre F-J. Association between obesity and periodontal disease. A systematic review of epidemiological studies and controlled clinical trials. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017;22(6):e708–15.
64. Moraschini V, Calasans-Maia J de A, Calasans-Maia MD. Association between asthma and periodontal disease: A systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2018;89(4):440–55.
65. Shen T-C, Chang P-Y, Lin C-L, Wei C-C, Tu C-Y, Hsia T-C, et al. Risk of Periodontal Disease in Patients With Asthma: A Nationwide Population-Based Retrospective Cohort Study. *J Periodontol*. 2017;88(8):723–30.
66. Thomas MS, Parolia A, Kundabala M, Vikram M. Asthma and oral health: a review. *Australian Dental Journal*. 2010;55(2):128–33.
67. Weatherspoon DJ, Borrell LN, Johnson CW, Mujahid MS, Neighbors HW, Adar SD. racial and ethnic differences in self-reported periodontal disease in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Oral Health Prev Dent*. 2016;14(3):249–57.
68. Köberle B, Koch B, Fischer BM, Hartwig A. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and putative cancer risk. *Arch Toxicol*. 2016;90(10):2369–88.
69. Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005;39:91–117.
70. Yu J, Choi YJ, Choi S-H, Jung H-S, Lee JH, Cha J-Y. The effect of genetic polymorphisms on treatment duration following premolar extraction. *Sci Rep*. 2021;11(1):15942.
71. Liu K, Han B, Hou J, Meng H. Preliminary investigation on the molecular mechanisms underlying the correlation between VDR-FokI genotype and periodontitis. *J Periodontol*. 2020;91(3):403–12.

72. Lucena KCR, Corrêa MP, Leão JC, Souza PRE; Cimões R, Carvalho AAT. Influência dos polimorfismos da osteoprotegerina na suscetibilidade à doença periodontal em indivíduos com diabetes tipo 2. *Rev Odonto Cienc.* 2013;28(2):41-46.
73. Toy VE, Uslu MO. Do genetic polymorphisms affect susceptibility to periodontal disease? A literature review. *Niger J Clin Pract.* 2019;22(4):445–53.
74. Gomes-Filho IS, Trindade SC, Passos-Soares J de S, Figueiredo ACMG, Vianna MIP, Hintz AM, et al. Clinical diagnosis criteria for periodontal disease: an update. *Journal of Dental Health, Oral Disorders & Therapy.* 2018;9(5):354–6.
75. Cochran DL. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology.* 2008;79(8S):1569–76.
76. da Silva TA, Batista AC, Mendonça EF, Leles CR, Fukada S, Cunha FQ. Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2008;105(3):333–41.
77. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(7):481–90.
78. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* 2003;4(8):638–49.
79. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005;21(2):263–5.
80. Mu W, Zhang W. Chapter 8 - Molecular Approaches, Models, and Techniques in Pharmacogenomic Research and Development. In: Lam Y-WF, Cavallari LH, organizadores. San Diego: Academic Press; p. 273–94. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123919182000081>
81. Friedrichs S, Malzahn D, Pugh EW, Almeida M, Liu XQ, Bailey JN. Filtering genetic variants and placing informative priors based on putative biological function. *BMC Genet.* 2016;17(2):S8.
82. Friedrichs S, Malzahn D, Pugh EW, Almeida M, Liu XQ, Bailey JN. Filtering genetic variants and placing informative priors based on putative biological function. *BMC Genet.* 2016;17(2):S8.
83. Shriver MD, Smith MW, Jin L, Marcini A, Akey JM, Deka R et al. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am J Hum Genet.* 1997;60(4):957–64.
84. Fairley S, Lowy-Gallego E, Perry E, Flicek P. The International Genome Sample Resource (IGSR) collection of open human genomic variation resources. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D941–7.

85. Vidal C, Formosa R, Xuereb-Anastasi A. Functional polymorphisms within the TNFRSF11B (osteoprotegerin) gene increase the risk for low bone mineral density. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2011;47(3):327–33.
86. Borges de Castilhos B, Machado de Souza C, Simas Netta Fontana MLS, Pereira FA, Tanaka OM, Trevilatto PC. Association of clinical variables and polymorphisms in RANKL, RANK, and OPG genes with external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2019;155(4):529–42.
87. Roshandel D, Holliday KL, Pye SR, Ward KA, Boonen S, Vanderschueren D, et al. Influence of polymorphisms in the RANKL/RANK/OPG signaling pathway on volumetric bone mineral density and bone geometry at the forearm in men. *Calcif Tissue Int*. dezembro de 2011;89(6):446–55.
88. Mrozikiewicz-Rakowska B, Nehring P, Szymański K, Sobczyk-Kopciół A, Płoski R, Drygas W et al. Selected RANKL/RANK/OPG system genetic variants in diabetic foot patients. *J Diabetes Metab Disord*. 2018;17(2):287–96.
89. Qi Y, An F, Wang J, Liu Y, Gao H, Ge Z et al. Association of OPG gene polymorphisms with the risk of knee osteoarthritis among Chinese people. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(6):e662.
90. Genre F, López-Mejías R, García-Bermúdez M, Castañeda S, González-Juanatey C, Llorca J et al. Osteoprotegerin CGA haplotype protection against cerebrovascular complications in anti-CCP negative patients with rheumatoid arthritis. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e106823.
91. Wang J, Wang Y, Zhao Y, Li Y, Sun M, Na R, et al. Polymorphisms of genes in the OPG/RANKL/RANK pathway in the Mongols of Inner Mongolia China: Relationship to other populations. 29 de fevereiro de 2016;9:3851–9.
92. Duan P, Wang Z-M, Liu J, Wang L-N, Yang Z, Tu P. Gene polymorphisms in RANKL/RANK/OPG pathway are associated with ages at menarche and natural menopause in Chinese women. *BMC Womens Health*. 13 de abril de 2015;15:32.
93. Chen Y, Xiong D-H, Yang T-L, Yang F, Jiang H, Zhang F, et al. Variations in RANK gene are associated with adult height in Caucasians. *American Journal of Human Biology*. 2007;19(4):559–65.
94. Y L, P L, Rr R, Hw D, V D. TNFRSF11A and TNFSF11 are associated with age at menarche and natural menopause in white women. *Menopause*. 2010;17(5):1048–54.
95. Zhao L-J, Guo Y-F, Xiong D-H, Xiao P, Reker RR, Deng H-W. Is a gene important for bone resorption a candidate for obesity? An association and linkage study on the RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) gene in a large Caucasian sample. *Hum Genet*. 2006;120(4):561–70.
96. Gurgel BC de V, Ribeiro EDP, Sallum EA, Sallum AW, Toledo S de, Casati MZ. Influência da resposta do hospedeiro e sua modulação na patogênese e terapia periodontal. *Rev Int Periodontia Clin*. 2005; 2(4):38-44

97. Kinane DF, Hart TC. Genes and polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(6):430-49.
98. Gomes-Filho IS, Soledade-Marques KR, Seixas da Cruz S, de Santana Passos-Soares J, Trindade SC, Souza-Machado A et al. Does Periodontal Infection Have an Effect on Severe Asthma in Adults? *J Periodontol.* 2014; 85(6):179-87.
99. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *Journal of periodontology.* 2007; 78(7 Supl):1387-99.
100. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ, Beck J et al. Prevalence of periodontitis in adults in United States: 2009 and 2010. *J Dent Res.* 2012; 91(10):914-20.
101. Dvornyk V. Integrated in-depth bioinformatic analysis suggests RELCH/KIAA1468, LINC02341, and AKAP11 as candidate genes for ages at menarche and menopause. *Research Results in Biomedicine.* 2021;7(3):220-31.
102. Iwashita M, Hayashi M, Nishimura Y, Yamashita A. The Link Between Periodontal Inflammation and Obesity. *Curr Oral Health Rep.* 2021;1-8.
103. Chung PYJ, Beyens G, Riches PL, Van Wesenbeeck L, de Freitas F, Jennes K, et al. Genetic variation in the TNFRSF11A gene encoding RANK is associated with susceptibility to Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 2010;25(12):2592-605.
104. Jin Y, Andersen G, Yorgov D, Ferrara TM, Ben S, Brownson KM, et al. Genome-wide association studies of autoimmune vitiligo identify 23 new risk loci and highlight key pathways and regulatory variants. *Nat Genet.* 2016;48(11):1418-24.
105. MacInnes SJ, Vescovo ED, Kiss-Toth E, Ollier WER, Kay PR, Gordon A, et al. Genetic variation in inflammatory and bone turnover pathways and risk of osteolytic responses to prosthetic materials. *Journal of Orthopaedic Research.* 2015;33(2):193-8.
106. STRING. Disponível em: <https://string-db.org/>. Trata-se de uma plataforma sobre genética.

APÊNDICE – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Registro CONEP 15782 / Processo nº 25000.013834/2010-96****Projeto de Pesquisa:** “Fatores de risco, biomarcadores e endofenótipos da asma grave”.
(Pesquisador Responsável: Dr. Álvaro Augusto Souza da Cruz Filho)**Subprojeto:** Doença Periodontal: Fator de risco associado à asma grave? (Pesquisador Responsável: Isaac Suzart Gomes Filho)**Instituições envolvidas:** Universidade Federal da Bahia

Universidade Estadual de Feira de Santana

Este trabalho de pesquisa será desenvolvido em pacientes acompanhados pelo Programa para o Controle da Asma e da Rinite Alérgica na Bahia (ProAR). Cada participante permitirá que sejam feitas perguntas a respeito dos seus hábitos, de modo a contribuir para o conhecimento do grupo estudado, além de darem acesso aos exames clínicos de rotina para avaliar a saúde da boca. As perguntas serão feitas através de um questionário e os exames bucais serão feitos pela pesquisadora participante, Kaliane Rocha Soledade Marques. Os exames na boca servem para avaliar a presença e a gravidade da doença da gengiva e dos dentes, com o uso de um espelho bucal e um instrumento metálico esterilizado, em volta de todos os dentes. Esses exames não apresentam risco à saúde do participante, mas podem causar um leve desconforto e podem necessitar de certo tempo com a boca aberta. Os resultados dos exames médicos dos participantes que tenham asma serão também avaliados para observar se existe a relação com a condição bucal. Os participantes serão encaminhados para realização de radiografia panorâmica para constatação de possíveis problemas bucais. Caso sejam constatados problemas, os pacientes serão encaminhados para tratamento nas clínicas odontológicas vinculadas à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia. Informamos ainda que os resultados desta pesquisa servirão para dentistas e outros profissionais de saúde compreenderem melhor o papel da condição bucal no desenvolvimento da asma. Os dados obtidos serão guardados em segredo e sob a responsabilidade dos profissionais que trabalharão na pesquisa. Quando os resultados forem publicados, os participantes não serão

identificados. Caso não queira participar do estudo, o sujeito convidado terá liberdade de recusar ou abandonar a pesquisa, sem qualquer prejuízo. Além disso, despesas decorrentes da participação na pesquisa serão pagas pelos pesquisadores, assim como qualquer indenização ou ressarcimento por qualquer dano que porventura possa ocorrer. Portanto, atenção: sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisas da Maternidade Climério de Oliveira / Universidade Federal da Bahia (UFBA), no endereço: Rua do Limoeiro, 137 Nazaré, Salvador-BA ou pelo telefone: (71) 3283-9211. Os pesquisadores responsáveis por essa pesquisa também estão disponíveis para maiores esclarecimentos. Duas vias serão assinadas e uma via será retida pelo participante de pesquisas.

Salvador-Bahia, ___ / ___ / _____

Assinatura do Voluntário ou Marca Digital

Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura da Pesquisadora Participante

ANEXO – TERMO DE APROVAÇÃO NO CONSELHO DE ÉTICA EM PESQUISA**CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE****COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA****PARECER Nº 450/10****Registro CONEP 15782 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)****Processo nº 25000.013834/2010-96****Projeto de Pesquisa:** *“Fatores de risco, biomarcadores e endofenótipos da asma grave”*.**Pesquisador Responsável:** Dr. Álvaro Augusto Souza da Cruz Filho**Instituição:** Universidade Federal da Bahia (**CENTRO ÚNICO**)**CEP de origem:** Maternidade Climério de Oliveira / Universidade Federal da Bahia (UFBA)**Área Temática Especial:** Pesquisa com cooperação estrangeira; Genética humana**Patrocinador:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)