

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
FISIOPATOLOGIA

ALÉIA HARUMI UCHIBABA YAMANAKA

Estudo de associação entre os polimorfismos dos genes que codificam a
Interleucina-33 (*IL33*) e seu receptor (*IL1RL1*) na patogênese da periodontite

Maringá
2020

ALÉIA HARUMI UCHIBABA YAMANAKA

Estudo de associação entre os polimorfismos dos genes que codificam a Interleucina-33 (*IL33*) e seu receptor (*IL1RL1*) na patogênese da periodontite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia.

Área de concentração: Biociências e Fisiopatologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof^o Dr. Quirino Alves de Lima Neto

Coorientadora: Dr^a Josiane Bazzo de Alencar

Maringá
2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

Y19e

Yamanaka, Aléia Harumi Uchibaba

Estudo de associação entre os polimorfismos dos genes que codificam a Interleucina-33 (IL33) e seu receptor (IL1RL1) na patogênese da periodontite / Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka. -- Maringá, PR, 2020.

87 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Quirino Alves de Lima Neto.

Coorientadora: Profa. Dra. Josiane Bazzo de Alencar .

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia (PBF), 2020.

1. Periodontite. 2. Alarminas. 3. Associação genética - Estudos. 4. Polimorfismos genéticos. I. Lima Neto, Quirino Alves de , orient. II. Alencar , Josiane Bazzo de , coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia (PBF). IV. Título.

CDD 23.ed. 617.632

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALÉIA HARUMI UCHIBABA YAMANAKA

“Estudo de associação entre os polimorfismos dos genes que codificam a interleucina-33 (IL33) e seu receptor (IL1RL1) na patogênese da periodontite”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Quirino Alves de Lima Neto

Dr.^º Quirino Alves de Lima Neto
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Ana Maria Sell

Dr.^ª Ana Maria Sell
(UEM – membro)

Samira Salmeron

Dr.^ª Samira Salmeron
(UNINGÁ - FOB/USP – membro)

Aprovado em: 16 de dezembro de 2020

Defesa: pela Universidade Estadual de Maringá de forma remota.

Horário: 14h00min.

DEDICATÓRIA(S)

Dedico este trabalho a todos aqueles que
contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTO(S)

À esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram um ambiente criativo e amigável que me propiciava crescer criativa e intelectualmente.

Ao Prof. Drº Quirino Alves de Lima Neto, pela orientação durante elaboração deste trabalho.

À Josiane Bazzo de Alencar pela coorientação, ajuda e paciência durante o desenvolvimento das atividades.

À Prof. Drª Ana Maria Sell que embora não faça parte da elaboração deste trabalho me deu grandes oportunidades para desenvolver outras pesquisas ao longo da graduação e durante a pós-graduação.

Ao Laboratório de Imunogenética (LIG-UEM) e todos os seus profissionais por me receber de braços abertos e permitir que eu me desenvolvesse profissionalmente e como pesquisadora.

À minha adorada mãe Marcia AssakaUchibaba por sempre me tranquilizar e motivar a não desistir ao mesmo tempo que me dava liberdade para tomar as decisões, mesmo não concordando.

Aos meus amigos dentro e fora da universidade, grandes companheiros que levarei para a vida, que compartilharam momentos felizes, mais ainda momentos de desespero, e tomadas de decisão, em especial a Amanda Carrasco Duarte pela lealdade e ajuda nos momentos mais difíceis que enfrentei.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

Estudo de associação entre os polimorfismos dos genes que codificam a Interleucina-33 (*IL33*) e seu receptor (*IL1RL1*) na patogênese da periodontite

RESUMO

A periodontite (PD) é uma doença inflamatória que se caracteriza pela extensa destruição dos tecidos de proteção e de sustentação dos dentes, mediada por células e moléculas do sistema imunológico. Assim, citocinas e quimiocinas podem interferir na imunopatogênese da PD, porém o papel da IL-33 e seu receptor ainda não está claro. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos polimorfismos nos genes *IL33* (*rs1929992 T>C* e *rs7025417 T>C*) e *IL1RL1* (*rs11685424 G>A* e *rs3821204 C>G*), bem como os níveis séricos de IL-33 na patogênese da PD. Para isso, foi realizado um estudo caso-controle com 186 pacientes com PD e 189 indivíduos sem a doença. Os participantes incluídos nesse estudo apresentavam mais de 30 anos de idade e no mínimo 20 dentes na cavidade oral. Os critérios de não inclusão foram indivíduos com diabetes mellitus, infecções agudas, doenças de comprometimento ósseo, uso de antibióticos ou anti-inflamatórios, caso de gengivite ou periodontite nos estágios I e IV e grau C e que fizeram tratamento periodontal nos últimos 6 meses. A determinação dos genótipos de cada SNPs se deu pela técnica de PCR-SSP e os níveis séricos de IL-33 foram determinados pelo método imunoenzimático (ELISA). O poder estatístico foi calculado com o programa QUANTO versão 1.2.4. As comparações das frequências entre casos e controles foram realizadas pelo teste do qui-quadrado e por regressão logística (software OpenEpi e SNPStats). O *OddsRatio* (OR) foi avaliado para *P*-valor significativo. As análises da dosagem de IL-33 foram realizadas pelo programa BioEstat 5.0. O teste Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliar a normalidade das amostras, e o teste *t* de *student* foi escolhido para avaliar correlação entre os grupos de pacientes. Para todos os testes, considerou-se $P > 0,05$ com significância estatística. O genótipo *IL33 rs7025417 C/C* foi associado a risco para o desenvolvimento da PD no modelo recessivo (OR=12.86, IC=1.60 - 103.49, $P_c=0.002$). O genótipo *IL1RL1 rs3821204 G/G* foi menos frequente em pacientes quando comparado com controles no modelo recessivo (OR=0.19, IC=0.05 - 0.72, $P_c=0.012$). Os níveis séricos de IL-33 estavam aumentados em pacientes vs. controles (média $\pm$ DP: 250,4 $\pm$ 54,4 pg/mL vs. 0,0 $\pm$ 0,0 pg/mL; $P < 0.0001$), porém sem alterações dentro dos grupos de pacientes. Não foram observadas diferenças estatísticas entre pacientes e controles na distribuição alélica e genotípica para os SNPs *IL33 rs1929992* e *IL1RL1 rs11685424*. Os

polimorfismos de *IL33 rs7025417* e do receptor *IL1RL1 rs3821204* foram associados com o desenvolvimento da PD, conferindo risco e proteção, respectivamente, e a produção de IL-33 foi maior em pacientes que em controles, independente da extensão ou severidade da doença.

Palavras-chave: Periodontite. Alarminas. Proteína 1 semelhante a receptor de interleucina-1. Estudos de associação genética.

Association study among the polymorphisms of the genes encoding Interleukin-33 (*IL33*) and its receptor (*IL1RL1*) in the pathogenesis of periodontitis

ABSTRACT

Periodontitis (PD) is an inflammatory disease characterized by an extensive destruction of the protective and supporting tissues of the teeth, mediated by cells and molecules of the immune system. Thus, cytokines and chemokines could interfere in the immunopathogenesis of PD, but the role of IL-33 and its receptor in disease is unclear. Thereby, the objective of this work was to evaluate the influence of polymorphisms in the *IL33* (*rs1929992 T> C* and *rs7025417 T> C*) and *IL1RL1* (*rs11685424 G>A* and *rs3821204 C> G*) genes, as well as the serum levels of IL-33 in the pathogenesis of PD. For this, a case-control study was performed in 186 patients with PD and 189 controls. Participants included in this study were over 30 years old and at least 20 teeth in the oral cavity. The non-inclusion criteria were individuals with diabetes mellitus, acute infections, bone involvement diseases, use of antibiotics or anti-inflammatories, cases of gingivitis or periodontitis in stages I and IV, and grade C and who underwent periodontal treatment in the last 6 months. The determination of the genotypes of each SNPs was made by the PCR-SSP and the serum levels of IL-33 were determined by the immunoenzymatic method (ELISA). The statistical power was calculated with the QUANTO program version 1.2.4. Comparisons of frequencies between cases and controls were performed using the chi-square test and logistic regression (OpenEpi and SNPStats software). Odds Ratio (OR) was considered for significant *P*-value. The IL-33 serum levels were analyzed using the BioEstat 5.0 program. The Shapiro-Wilk test was applied to evaluate the normality of the samples, and the Student's *t* test was chosen to determine a correlation between groups of patients. For all tests, *P* < 0.05 was considered statistically significant. The *IL33 rs7025417 C/C* genotype was associated with risk for the development of PD in the recessive model (OR = 12.86, CI = 1.60 - 103.49, *P*_c = 0.002). The *IL1RL1 rs3821204 G/G* genotype was less frequent in patients than in controls in recessive model (OR = 0.19, CI = 0.05 - 0.72, *P*_c = 0.012). Serum levels of IL-33 were increasing in patients vs. controls (mean ± SD: 250.4 ± 54.4 pg mL vs. 0.0 ± 0.0 pg/mL; *P* < 0.0001), but with no changes within the groups of patients. No statistical differences were observed between patients and controls in the allele and genotype frequency distributions of *IL33 rs1929992* and *IL1RL1 rs11685424*. The polymorphisms of *IL33 rs7025417* and *IL1RL1 rs3821204* were associated with the development of PD, conferring risk and protection,

respectively, and the production of IL-33 is higher in patients than controls, regardless of the extent or severity of the disease.

Keywords: Periodontitis. Alarmins. Interleukin-1 receptor-like 1 protein. Genetic association studies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: A patogênese da periodontite humana.	20
Figura 2: Liberação extracelular de IL-33 e ativação por proteases inflamatórias de mastócitos e neutrófilos.	34
Figura 3: Via de sinalização intracelular IL-33/ST2 e seus mecanismos de regulação.	35
Figura 4: O gene e a proteína da IL-33 humana.	41
Figura 5: Gene <i>IL1RL1</i> e os RNA mensageiro formado por diferentes splicing alternativos...	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1	Proteína ativadora 1
APCs	Células apresentadoras de antígenos (<i>Antigen-Presenting Cells</i>)
AR	Artrite reumatoide
AREG	Fator de crescimento anfiregulina
BoP	Sangramento à sondagem (<i>Bleeding on Probing</i>)
CAL	Perda de inserção clínica (<i>Clinical Attachment Loss</i>)
CTLA-4	Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i>)
Cys	Resíduos de cisteína
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos (<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>)
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular (<i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i>)
FGF	Fatores de crescimento de fibroblastos (<i>Fibroblast Growth Factors</i>)
GCF	Fluido crevicular gengival (<i>Gingival Crevicular Fluid</i>)
GM-CSF	Fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IFN- γ	Interferon γ
Ig	Imunoglobulina
I κ B	Proteína inibitória I κ B
IL	Interleucina
IL-1RAcP	Proteína acessória do receptor de IL-1 (<i>Interleukin 1 Receptor Accessory Protein</i>)
IL1RL1	Receptor de interleucina 1 tipo 1 (<i>Interleukin 1 Receptor Like 1</i>)
ILC2	Células linfóides inatas do tipo 2
IRAK	Quinases intracelulares associadas ao receptor de IL-1
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LIF	Fator inibidor de leucemia (<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos (<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>)

MALT	Tecido linfóide associado à mucosa (<i>Mucosal Associated Lymphoid Tissue</i>)
MAPKs	MAP quinase (<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>)
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MMPs	Metaloproteínas de Matriz (<i>Matrix Metalloproteinase</i>)
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88 (<i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i>)
NF-κB	Fatores de transcrição kappa B (<i>Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer of Activated B Cells</i>)
NFATc1	Fator nuclear das células T citoplasmáticas 1 ativadas (<i>Nuclear Factor of Activated T Cells Cytoplasmic 1</i>)
NKs	Células <i>Natural Killers</i>
NKTs	Células <i>Natural Killer T</i>
PAD	<i>Peptidylarginine deiminase</i>
PAMPs	Padrão moleculares associados a patógenos (<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>)
PD	Periodontite
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>Platelet Derived Growth Factors</i>)
PGE2	Prostaglandina E2
PMNs	Células polimorfonucleares
PS	Profundidade de sondagem
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (<i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
<i>rs11685424 G>A</i>	Polimorfismo de <i>IL1RL1</i> G>A
<i>rs1929992 T>C</i>	Polimorfismo de <i>IL33</i> T>C
<i>rs3821204 C>G</i>	Polimorfismo de <i>IL1RL1</i> C>G
<i>rs7025417 T>C</i>	Polimorfismo de <i>IL33</i> T>C
SIGIRR	<i>Single Immunoglobulin IL-1 Receptor-Related Molecule</i>
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
sST2	Proteína ST2 solúvel

ST2	Proteína ST2
ST2L	Proteína ST2 transmembranar
ST2LV	Variante da proteína ST2 transmembranar
ST2V	Variante da proteína ST2
TC1	Células T citotóxico 1 (<i>Type 1 Cytotoxic T</i>)
TCR	Receptores de célula T (do inglês <i>T-Cell Receptor</i>)
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta (<i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
Th	Células T auxiliares (<i>T helper Cells</i>)
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases (<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>)
TIR	Receptor Toll IL-1 (<i>Toll-interleukin-1 receptor</i>)
TLRs	Receptores do Tipo Tool (<i>Toll-Like Receptor</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor α</i>)
TRAF-6	Fator 6 associado ao receptor de TNF
Treg	Linfócito T regulador

Dissertação elaborada e formatada conforme as
normas das publicações científicas: Journal of
Periodontol Research (artigo 1)

Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/16000765/homepage/forauthors.html>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	16
1. Introdução: resposta imuológica.....	16
2. Periodontite.....	18
3. Imunologia da periodontite.....	23
4. Fatores de risco associados ao desenvolvimento da periodontite	28
5. Classificações da periodontite	30
6. Diagnóstico e tratamento da periodontite	31
7. Il-33 e st2: funções e mecanismos biológicos	32
8. Relação entre o eixo il-33/st2 e a periodontite	37
9. Polimorfismos em <i>il33</i> e <i>il1rl1</i> e a relação com a periodontite.....	40
10. Justificativa.....	44
11. Objetivos.....	45
11.1 Geral.....	45
11.2 Específicos	45
12. Referências Bibliográficas.....	46
CAPÍTULO II.....	62
The influence of genetic polymorphisms of <i>IL33</i> and <i>IL1RL1</i> genes on the immunopathogenesis of periodontitis	62
CAPÍTULO III	84
1. Conclusões.....	84
2. Perspectivas futuras	84
ANEXOS	85

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO: RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A resposta imunológica atua em cooperação mútua com uma complexa rede de células e moléculas modulando a resposta contra agentes infecciosos e células danificadas. Desse modo, o sistema imune é ativado por bactérias, vírus, helmintos ou substâncias reconhecidas como estranhas. Além disso, outra função muito importante está relacionada a reparação dos tecidos e homeostase do sistema. O combate a organismos patogênicos é tão ou mais importante quanto tolerar o próprio. A incapacidade de distinguir epítomos estranhos de próprios ocasiona o surgimento de doenças autoimunes como lúpus, doença de Crohn ou vitiligo. Além de fazer esse reconhecimento, o sistema imune precisa ativar as vias de atuação de modo preciso, ou seja, uma resposta exacerbada compromete os tecidos ou órgão de modo local ou sistêmico. Por outro lado, uma resposta ineficiente, sem a eliminação total dos patógenos, permite a sobrevivência e manutenção dos agentes patogênicos. Assim, a imunologia desempenha um papel importante na defesa, tolerância e reparação tecidual(1).

A resposta imune é dividida em resposta imune inata (ou natural) e adaptativa (ou adquirida). Como o nome sugere, a primeira está presente desde o nascimento, representado por barreiras físicas e químicas, elementos celulares, humorais e moléculas solúveis. A produção e liberação de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, ativação de proteínas do sistema complemento e fagocitose são mecanismos imunológicos inatos. A imunidade inata atua de maneira rápida no foco infeccioso mediante o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) e dos padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês *Damage-Associated Molecular Patterns*). Embora a resposta imune inata seja eficiente, seu espectro de atuação é limitado. As principais células efetoras são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e Natural Killer (NK). Caso o problema não seja sanado, as células dendríticas ativam a resposta adaptativa através da apresentação de antígenos. Mesmo após ativação, as respostas inatas não cessam, ao invés disso, trabalham em sinergia com a resposta adaptativa. A imunidade adaptativa se diferencia pela alta especificidade e pela capacidade de memória, ou seja, frente ao mesmo antígeno, a resposta é mais rápida e eficiente. Os linfócitos são o

principal grupo celular e são divididos em linfócitos B e T, produzindo anticorpos e/ou citocinas (1).

Os elementos imunológicos, como proteínas e componentes moleculares participam da defesa e manutenção da homeostase e podem ter sua produção ou conformação alterada por mutações nos genes. Essas mutações são as principais fontes da diversidade genética importante no processo de seleção natural e adaptação entre espécies. O genoma humano é composto por 3 bilhões de bases nitrogenadas sendo que aproximadamente 10 milhões são polimorfismo de nucleotídeos único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*), dentre os quais 50.000 a 250.000 são biologicamente importantes(2,3). Os SNPs são os polimorfismos mais frequentes dentro do genoma, e é consequência da troca de um único nucleotídeo com frequência superior a 1% dentro de uma população. Os SNPs em regiões codificantes, como *exons*, podem alterar a conformação e função da proteína expressa devido a troca de aminoácidos, ou gerando um códon de parada prematuro. As mutações em regiões não codificantes, como região promotora e intrônica, pode levar à modificações da quantidade de proteína (4).

Frequentemente os SNPs são analisados em estudos de associação, na tentativa de enquadrá-los como um marcador genético na suscetibilidade de doenças. As análises são baseadas na diferença da frequência desse SNP entre pacientes com uma dada doença (grupo caso) e indivíduos sem a mesma doença (grupo controle). Um bom exemplo de marcador genético é o HLA-B*27 em pacientes com espondilite anquilosante. O HLA-B*27 é encontrado em 80% a 90% da população com a doença, em comparação com 6% a 9% da população geral(5,6). Mesmo que um marcador genético seja descoberto como um preditor de doenças, os mesmos parâmetros não podem ser extrapolados para todas as populações e vários fatores externos devem ser levados em consideração.

A frequência dos polimorfismos genéticos não é constante para todas as populações, assim as frequências alélicas e genotípicas podem variar de acordo com a região global ou grupo étnico o que confere um caráter singular (7). A combinação de diversos polimorfismos no genoma pode modificar a maneira que o indivíduo responde a um dado estímulo, modificando a suscetibilidade e progressão da doença. Pensando nisso, como a periodontite advém do desequilíbrio da resposta imune, os SNPs podem influenciar na doença (8–10).

2. PERIODONTITE

A periodontite (PD) é uma doença de cunho infecciosa causada por estímulos de bactérias gram-negativas que se acumulam no sulco periodontal (11). Embora a formação do biofilme bacteriano seja crucial para o desenvolvimento da PD, apenas sua presença não é garantia de evolução do caso clínico, uma vez que, a progressão da doença depende de diversos outros fatores. Higiene oral, doenças e hábitos previamente associadas ao risco, como diabetes, doenças de comprometimentos ósseo (artrites e reumatismo) ou tabagismo, composição genética e epigenética podem determinar o curso da PD para cada indivíduo (figura 1). Com o somatório desses fatores fica fácil prever que cada pessoa responde a infecção por essas bactérias de uma forma única, não sendo incomum que um mesmo paciente apresenta sítios de acometimentos em diferentes estágios (12,13).

A gengivite e aPD estão entre as doenças bucais com maior prevalência no mundo. A PD leve e moderada são as formas mais frequentes, variando de 13% a 57%, em comparação com a PD severa que atinge 10 a 25% da população(14). No Brasil, a prevalência entre adultos de 35 a 44 anos, chega a 90% da população nacional (15). As divergências entre as taxas de prevalência podem ser atreladas com o desenvolvimento dos países. Estudos apontam que a falta de higiene oral e de investimentos nos setores de saúde oral estão intimamente relacionados aos altos índices de doenças bucais, incluindo a PD(15,16).

As bactérias causadoras da PD são capazes de produzir proteínas proteolíticas que degradam os tecidos periodontais do hospedeiro. Esta ação destrutiva torna o local levemente alcalino (pH 7,4 a 7,8) quando comparado a um sítio saudável (pH 6,9)(17). Mesmo assim, a PD é causada por uma complexa rede de interação entre a resposta imunológica do hospedeiro e a microbiota da cavidade oral. Por conta disso, várias espécies de bactérias foram associadas com o desenvolvimento da PD, enquanto outras com a saúde periodontal (*Veillonellaparvula*, *Actinomycesodontolyticus* e espécies de *Streptococcus*) e, ainda, bactérias comensais(18). Socransky(11) propôs um modelo de mapeamento dos microrganismos e os dividiu em cinco complexos, sendo que os complexos laranja e vermelho possuem uma relação mais forte com a PD, enquanto os complexos verde, amarelo, roxo e *Actinomycesnaeslundii* estão geralmente associados a sítios periodontais saudáveis (11,17).

As bactérias do complexo laranja, principalmente *Prevotella intermedia* e *Fusobacteriumnucleatum* podem estar presentes em sítios periodontais ativos e antecedem a colonização das bactérias do complexo vermelho, uma vez que exibem forte associação com

este grupo. O complexo vermelho é composto por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, que são os principais agentes etiológicos da PD, relacionados com a agressividade do biofilme e mecanismos destrutivos ao tecido(17,19). *P. gingivalis* sozinha, ou em combinação com as outras duas bactérias do grupo vermelho, causam maiores taxas de profundidade da bolsa, além de estar associadas com a progressão da doença(11,20). Outro importante agente etiológico é *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* outra bactéria gram negativa anaeróbica, agrupado no complexo verde, relacionado com a etiologia da PD(21), sendo frequentemente encontrados nos tecidos moles e placa supragengival(11).

Apesar disso, o alto dinamismo dos patógenos deve ser um fator a ser considerado. Na gengiva saudável, observa-se poucas bactérias e na sua grande maioria são representadas por cocos e bastonetes simples e na gengiva doente, há aumento de espiroquetas e bastonetes móveis (22). Na maioria das doenças infecciosas o patógeno enfrentado é apenas um, do início ao fim, diferente do que acontece durante o percurso clínico da PD. Nos sítios de acometimento pela doença, observa-se alto dinamismo de espécies de bactérias, ou seja, são observadas mudanças na flora bacteriana oral no decorrer da doença, onde são encontradas várias espécies danosas em uma etapa da doença, e ausente em outras (16). Apesar disso, os agentes etiológicos da PD compartilham entre si a capacidade de colonização; capacidade de produzir substâncias que possa iniciar diretamente a destruição do tecido; capacidade de esquivar da resposta imune do hospedeiro. Assim, mecanismos de evasão desenvolvidos por essas bactérias, como a habilidade de eliminar diretamente as células do sistema imune do hospedeiro devido a produção de enzimas (proteases, collagenase); produção de enzimas proteolíticas que impedem o recrutamento de outras células e produção de fatores que suprimem a resposta, são estratégias que permitem a sobrevivência e permanência no local(12).

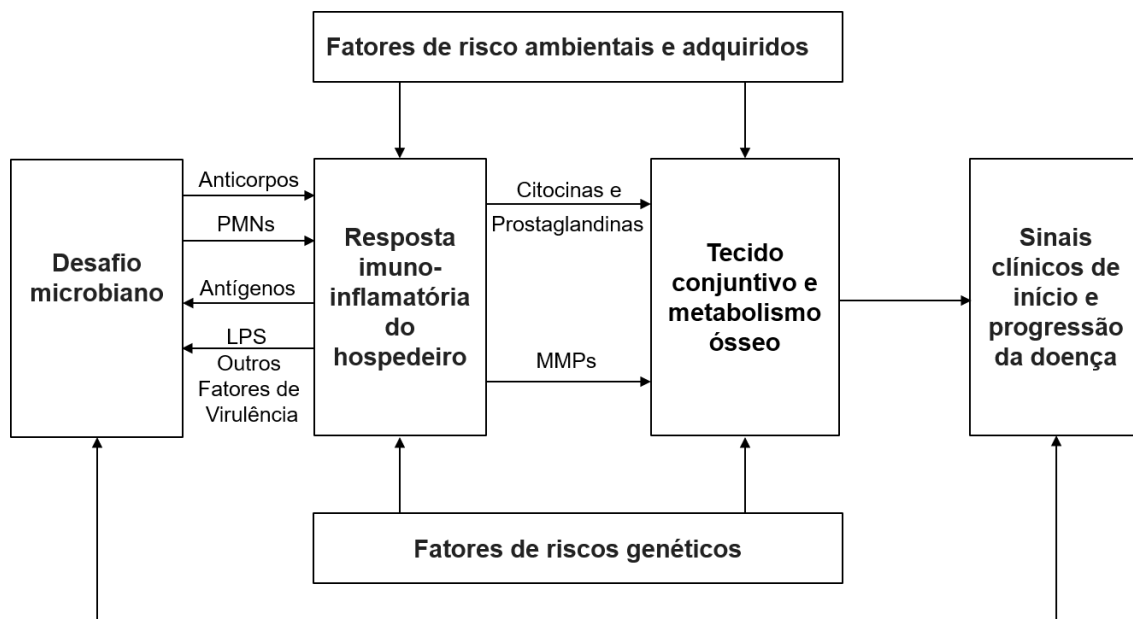


Figura 1: A patogênese da periodontite humana. A patogênese da periodontite compreende uma interação complexa entre o desafio microbiano e a resposta imunológica do hospedeiro. Defeitos no estado imunoinflamatório do hospedeiro ou condições predisponentes como diabetes, obesidade, tabagismo podem alterar a microbiota oral. Somado a estes fatores, características genéticas do hospedeiro também estão relacionadas à resposta imunológica e ao início e progressão da PD. A inflamação causada pela microbiota depende em grande parte da resposta imunológica do hospedeiro, que provoca a destruição do tecido periodontal de proteção e suporte. A ativação de células de defesa resulta na produção de mediadores inflamatórios como citocinas, prostaglandinas e enzimas proteolíticas que alteram o tecido conjuntivo e, por conseguinte, o metabolismo ósseo. Os produtos de degradação dos tecidos fornecem nutrientes e proteção aos microrganismos, o que aumenta sua prevalência. Portanto, a destruição de tecido gera um ciclo patogênico autopropagante. PMNs: Linfócitos polimorfonucleares, MMPs: Metaloproteínas de Matriz. **Fonte:** Adaptado de Page e Kornman, 1997(23).

A anatomia do periodonto possui características únicas, com formação do epitélio juncional aderido à superfície do dente e a fenda gengival que apresenta características peculiares e diferentes de outros sítios dentro da cavidade oral. O biofilme é uma estrutura organizada formada, além de outros componentes, por um agrupamento de bactérias envolvidas por uma matriz produzida por elas. O biofilme periodontal forma um microambiente que favorece a colonização pelas bactérias periodontopatogênicas e garante proteção e esconderijo para os organismos presentes, dificultando a ação do sistema imunológico(16). Somado a isso, algumas espécies bacterianas são capazes de invadir tecidos e células, aumentando a capacidade de persistir e multiplicar. *A. actinomycetemcomitans* passam através das células epiteliais para os tecidos conjuntivos subjacentes; *P. gingivalis* invadem e persistem nas células epiteliais e fibroblastos (12,24). Uma vez internalizada nas células do hospedeiro, os patógenos se tornam resistentes ao tratamento antibiótico com metronidazol ou amoxicilina, além disso, *P. gingivalis* são capazes de ativar vias anti-apoptóticas(24,25). Somados, todos esses fatores contribuem para o surgimento, manutenção e persistência da PD.

A cavidade oral é constantemente exposta a epítomos estranhos, como partículas alimentares, e, naturalmente, é colonizada por microrganismos comensais e patológicos(26). Embora as bactérias não patogênicas não causem danos diretamente aos tecidos, elas podem influenciar o desenrolar da doença sintetizando fatores específicos de crescimento ou defesa que aumentam o potencial de virulência dos organismos lá presentes(16). Cerca de 700 espécies de microrganismos convivem no mesmo local, porém apenas um seletivo grupo é capaz de estimular as reações inflamatórias do hospedeiro (27,28), assim, cabe as células do sistema imune diferenciar o que deve ser tolerado e o que precisa ser combatido(1). Em uma situação normal, sem a doença, a destruição é superada pela capacidade do corpo em se recuperar e regenerar, e assim, retomar a homeostase. Porém no decorrer da PD isso não é observado. Frequentemente a destruição dos tecidos é acompanhada com a progressão dos sintomas da doença, que em casos drásticos leva a perda do dente. É contraditório que as mesmas células que são recrutadas para combater a infecção e extinguir o problema são as maiores responsáveis pela destruição dos tecidos periodontais (23).

A PD se caracteriza pela destruição das estruturas de proteção e suporte do dente, como a gengiva, o ligamento periodontal e o tecido ósseo alveolar (29,30). O processo se inicia com estabelecimento e perturbação por uma comunidade de microrganismo na superfície mais próxima aos tecidos moles do periodonto, assim uma pequena resposta inflamatória é montada, causando uma lesão inicial. As bactérias contribuem diretamente para a destruição dos tecidos, através da produção e liberação de sulfeto de hidrogênio (H_2S), ácido butírico, enzimas proteolíticas, endotoxinas e resíduos de metabolismo. Apesar disso, a maior causa de dano provém da própria resposta imunológica do indivíduo (23).

Lesões na fenda gengival se tornam uma bolsa periodontal, ainda mais anaeróbica e com aumento do fluxo de fluido crevicular gengival (GCF, do inglês *GingivalCrevicularFluid*). Embora o GCF forneça proteínas e glicoproteínas para as bactérias periodontopatogênicas, também auxilia no combate contra os invasores, dirigindo as repostas humorais e celulares, levando a um processo inflamatório acompanhada do aumento da temperatura.

No interior da bolsa periodontal encontram-se as bactérias que iniciaram o processo e seus produtos, restos alimentares, mucina salivar, células epiteliais descamadas e leucócitos. As bolsas periodontais se caracterizam pela inflamação crônica local e, constantemente, sofrem processo de reparação. A reparação do tecido não é total, uma vez que, o local continua sob a influência dos microrganismos patológicos que novamente ativam as vias de resposta

imunológica do hospedeiro. Assim o ciclo é mantido. Por um lado, temos a degradação dos tecidos recém formados, ao passo que outras células atuam na recuperação do tecido lesionado. Esse constante processo de destruição e reparo torna o epitélio da bolsa frágil, delgado e com ulcerações. Histologicamente o local apresenta grande infiltrados de plasmócitos e células polimorfonucleares (PMNs), principalmente neutrófilos (22).

À medida que a doença progride ocorre o aprofundamento da bolsa em direção a raiz do dente. Nesse processo as fibras de colágeno próximas ao cimento são destruídas por metaloproteinases de matriz (MMPs, do inglês *Matrix Metalloproteinases*) para que o infiltrado celular se acomode. Mas, ao mesmo tempo, a estrutura fica exposta, favorecendo a perpetuação das espécies no local. Então o avanço e aprofundamento da bolsa é acompanhado da destruição dos tecidos, criando um espaço para alojar os patógenos e fornecendo abrigo e nutrição (12,22).

Apesar de parecer um processo constante, já que as bactérias e os componentes imunológicos permanecerem no local, as bolsas periodontais passam por períodos de exacerbação e quiescência. O período de quiescência apresenta resposta inflamatória reduzida com pouca ou nenhuma perda óssea e local de inserção, com grande infiltrado de linfócitos T. Enquanto o período de exacerbação é o oposto, com grande perda óssea, maior aprofundamento da bolsa, com predomínio de plasmócitos e linfócitos B(22,31). Esse dinamismo com surtos episódicos e períodos de calma é característico nos pacientes da PD(12,13).

Em geral o aprofundamento da bolsa periodontal é acompanhado da perda de inserção, mas nem sempre. Há casos em que as bolsas com diferentes profundidades podem apresentar o mesmo grau de perda de inserção; da mesma forma, bolsas com a mesma profundidade podem apresentar diferentes graus de perda de inserção. À medida que a bolsa se aprofunda em direção a raiz do dente e conseqüentemente do osso de sustentação, a placa bacteriana acompanha (22).

A PD é sempre precedida pela gengivite, porém há evidências de que a PD não é uma consequência inevitável da gengivite(12,13). Na gengivite, a inflamação está restrita aos tecidos moles, na margem gengival, caracterizada por sangramentos frequentes, edema e alteração da cor, forma e contorno da gengiva. Este processo inflamatório é reversível se a placa bacteriana for removida(16,32). A inflamação em PD se estende até o periodonto de sustentação. Ambas as doenças se iniciam com a perturbação da homeostase por bactérias gram-negativas anaeróbicas presentes no sulco gengival, levando a um processo inflamatório local. Os mecanismos envolvidos para a progressão da gengivite até PD ainda não foram totalmente elucidados. Porém, sabe-se que o biofilme bacteriano é alterado, aumentando a população de

organismos móveis ou espiroquetas (33). Histologicamente, observa-se mudanças no infiltrado do tecido conjuntivo subjacente. Em casos menos graves, com sintomas mais brandos, há predomínio de fibroblastos e linfócitos T; em sítios de grande acometimento ou períodos de exacerbação da resposta há predomínio de linfócitos B e plasmócitos(34). Parece que células produtoras de anticorpos são mais importantes em lesões consolidadas que os linfócitos T(12). Os anticorpos atuam na neutralização e opsonização e, ao final do processo, leva a destruição das bactérias, principalmente por neutrófilos, macrófagos e monócitos (1). Os neutrófilos são as principais células recrutadas para o combate de patógenos na PD(35).

A inflamação que se iniciou nos tecidos moles agora se estende para a superfície do osso alveolar (36). Nesse processo, as fibras gengivais e trans-septais são destruídas e reduzidas a fragmentos granulares desorganizados entremeados em meio às células inflamatórias e ao edema(37).

O processo de remodelação óssea em resposta ao estado inflamatório acontece com a interação entre mediadores produzidos por bactérias invasoras ou em resposta a elas. As bactérias periodontopatogênicas produzem mediadores que estimulam a diferenciação de precursores mononucleares para osteoclastos e diminui as funções efetoras dos osteoblastos, bem como sua quantidade (38). Em resposta a esses patógenos, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão são sintetizadas. Interleucinas (IL) -1 α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-33, fator de necrose tumoral α (TNF- α), MMPs e Prostaglandina E2 (PGE2) são capazes de induzir a reabsorção óssea(39–42). Esses dois eventos juntos podem potencializar o efeito destrutivo sobre o tecido ósseo. Em casos drásticos, a progressão se estende até a perda total do aparato de inserção periodontal, e o indivíduo perde o dente.

3. IMUNOLOGIA DA PERIODONTITE

O início da resposta imune se dá pela migração de leucócitos até o foco infeccioso. Para isso, os leucócitos precisam se aderir a parede dos vasos sanguíneos, atravessar o endotélio, reconhecer os patógenos e montar uma resposta adequada. Mesmo antes disso, a mucosa oral atua como barreira física impedindo a entrada de microrganismos e seus produtos, além de produzir citocinas inflamatórias e expressar moléculas de adesão. Entremeados no tecido conjuntivo adjacente, um grande número de linfócitos, células dendríticas, macrófagos e mastócitos estão presentes. Sob a barreira epitelial há os tecidos linfóides secundários não

encapsulados, mas organizados, chamado tecidos linfóides associados à mucosa (MALTs, do inglês *Mucosal Associated Lymphoid Tissue*). Essa estrutura contém células B e Tnaive, e células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *Antigen-Presenting Cell*) que desempenham papel na resposta imune adaptativa(1).

Caso a barreira física seja quebrada pelas bactérias orais, os fibroblastos em conjunto com outras células inflamatórias contribuem para a persistência da PD. Essas células expressam altos níveis de IL-1 β , IL-33, TNF- α , IL-6, IL-8, MMPs, inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs, do inglês *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*), ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL, do inglês *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand*) que estimulam a osteoclastogênese, destruição da matriz extracelular e manutenção do estado inflamatório no local (43,44).

A remodelação do tecido conjuntivo é um dos sintomas característicos observados em pacientes com PD. As MMPs somam uma família de pelos menos 26 membros de proteases extracelulares dependentes de zinco, e são produzidas por células residentes como fibroblastos, células epiteliais, e células do sistema imune. Essas moléculas são responsáveis pelo metabolismo ósseo, mas principalmente, pela destruição dos componentes da matriz extracelular como colágeno, elastina, gelatina, glicoproteínas de matriz e proteoglicanos e são regulados pelos TIMPs(35). O desequilíbrio entre MMP/TIMP leva a destruição descontrolada dos tecidos periodontais e a piora nos sintomas da PD(45).

As células inatas têm baixa capacidade de reconhecimento e menor especificidade quando comparada a imunidade adaptativa. Os receptores inatos reconhecem estruturas evolutivamente conservadas, como PAMPs, e DAMPs. O reconhecimento desencadeia a produção de mediadores inflamatórios destinados ao combate de antígenos estranhos. Os receptores do tipo toll (TLRs do inglês *Toll-Like Receptors*) fazem parte de uma família de receptores que reconhecem esses padrões. São expressos na membrana plasmática ou no interior de endossomos de macrófagos, neutrófilos, mastócitos, NK, células B, algumas linhagens de células T, fibroblastos, células epiteliais. Uma vez reconhecido, a cascata de sinalização intracelular é iniciada e culmina na ativação de fatores de transcrição kappa B (NF- κ B, do inglês *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells*) e MAP quinase (MAPK, do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinases*) e inicia-se a transcrição de genes de citocinas inflamatórias, interferons e quimiocinas. Em resposta a isso, várias células são recrutadas até o local da inflamação(1,35).

No caso da PD, as primeiras células a infiltrarem os tecidos periodontais são os linfócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, abundantes em infecções agudas(35). Após poucos minutos, uma vasta quantidade de neutrófilos se interpõe entre o biofilme e o epitélio juncional, dificultando a invasão das bactérias periodontopatogênicas. A liberação do conteúdo citoplasmático destas células causa a destruição das bactérias juntamente com os elementos da matriz extracelular, degradando células e tecidos próximos(46,47). Além do combate aos patógenos, os neutrófilos são responsáveis por secretar citocinas pró e anti-inflamatórias e quimiocinas. A IL-8 é produzida por neutrófilos, células endoteliais e por estímulos bacterianos. Esse mediador é capaz de atrair monócitos/macrófagos e outros neutrófilos para o local inflamado, existindo um mecanismo de *feedback* positivo entre as células inatas. Os macrófagos tornam-se efetores no local e iniciam a modulação de outras células, com a produção de mediadores que contribuem para a manutenção do estado inflamatório. Além disso, secretam IL-1 β , TNF- α , MMPs e TIMPs que estão associadas a destruição dos tecidos e reabsorção óssea(30). Apesar de importantes, nesse contexto, os macrófagos parecem estar mais associados a apresentação de antígenos para os linfócitos (35,46).

Os mastócitos também desempenham papel importante na progressão de PD. Embora sejam conhecidos como as principais células efetoras em respostas alérgicas, estudos demonstram o papel dessas células na defesa do hospedeiro, principalmente no combate contra bactérias(48). Durante o percurso da PD, a ativação dos mastócitos mediante citocinas e produtos bacterianos, causam a liberação de seu conteúdo citoplasmático, secreção de proteases inflamatórias (quimase e triptase), prostaglandinas, leucotrienos, histaminas, fatores de crescimento (GM-CSF - fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos), moléculas de adesão (molécula de adesão intracelular - ICAM-1, ICAM-2, e CD40L), citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-13) e quimiocinas (IL-8) que recrutam mais neutrófilos e NK para o local de injúria, e aumentando a inflamação local(49,50). Além disso, mastócitos são encontrados na gengiva em processo de cicatrização ou inflamadas (51,52).

Huang e colaboradores (53)observaram maior densidade de mastócitos totais e degranulados em pacientes com PD moderada e severa quando comparada com controles. Ambos os grupos celulares de mastócitos se apresentavam em maior quantidade à medida que a severidade da doença aumentava, acompanhada de sinais inflamatórios. Isso sugere que o acúmulo e a degranulação de mastócitos exercem papel crucial na hipersensibilidade da PD humana. As histaminas são os principais componentes liberados durante a degranulação de

mastócitos, e foram associados ao processo de remodelação óssea em modelo animal. Ratos com deficiência de histamina descarboxilase apresentavam menores populações de osteoclastos, combinada com aumento da formação óssea e redução da reabsorção óssea (54). O bloqueio dos receptores de histaminas reduz a ativação e o número de osteoclastos (55), assim, as histaminas produzidas e liberadas no foco infeccioso podem favorecer a reabsorção óssea e agravar os sintomas da PD.

As células dendríticas exibem projeções citoplasmáticas voltado para o lúmen, e estão em constante estado de vigília, procurando alvos potencialmente danosos. Em resposta ao reconhecimento de microrganismos, essas células se tornam móveis, e migram para um órgão linfóide próximo, onde se inicia o processo de apresentação de antígenos para linfócitos T CD4+ *naives*, devido ao reconhecimento do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) pelos receptores das células T (TCRs, do inglês *T-Cell Receptor*), tornando-as ativas e com maior capacidade de apresentação. Além disso, produz IL-12 e IL-18 que promovem a secreção de interferon γ (IFN- γ) por células NK e posteriormente por linfócitos T (35). Assim, inicia-se a resposta imune adaptativa em concomitante com a resposta imune inata.

Os linfócitos T são divididos quanto a sua função, em T citotóxicos e T auxiliares (Th, do inglês *T helper*). Com a interação entre as APCs e os linfócitos *Thnaive* ocorre o direcionamento para os subtipos Th1, Th2, Th17 ou T reguladores (Treg), dependendo do estímulo (1). Um linfócito T estimulado por IL-12 e INF- γ se diferencia para uma resposta Th1 de caráter inflamatório, porém na presença de IL-4, IL-5 ou IL-33 a célula polariza uma resposta Th2 e adquire característica anti-inflamatória pela indução de IL-10, reprimindo a resposta Th1 (35). Assim esse balanço determina se a resposta será protetiva ou não. Os linfócitos têm várias funções e atuam em muitas etapas da PD, auxiliando na homeostase dos tecidos periodontais (56), na resposta imunoinflamatória (57) e modulação da perda óssea (58).

Os linfócitos Th1 são predominantes em lesões periodontais prematuras ou estabilizadas. IFN- γ produzido por este tipo celular aumenta a atividade fagocítica de macrófagos e neutrófilos, contendo a infecção. Nessa situação, não há recuperação total, pois novas lesões são formadas devido ao embate permanente entre as células e as bactérias acumuladas no sulco gengival. Em um cenário com baixos níveis de IL-12, resposta forte induzida por células inatas e altas quantias de IL-4 há predomínio da resposta Th2, aumento de linfócitos B e plasmócitos e produção de anticorpos, característico de pacientes com lesão em

estágios avançados da PD (31,34). *P. gingivalis* são capazes de sintetizar proteases que hidrolisam IL-12 e reduzir a produção de IFN- γ mediada por IL-12 em células CD4+, favorecendo a resposta Th2 (59).

Independente do subtipo, os linfócitos T auxiliares foram relacionados com a progressão da PD. Por muito tempo se acreditou que as lesões periodontais provinham do desequilíbrio apenas das resposta Th1/Th2 (34). Embora seja uma boa explicação, apenas essa relação não pode explicar todos os eventos na doença. Assim, outros subtipos celulares podem estar envolvidos na patogênese da PD. Uma delas, as células do subtipo Th17 surgem na presença de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6 e baixas concentrações de TGF- β . Porém em situação oposta, o desequilíbrio é deslocado o sentido de diferenciação das células T para Treg (60). Então, acredita-se que o perfil de resposta Th17 assume papel inflamatório, com predomínio em lesão periodontal progressiva, enquanto a Treg desempenha caráter supressor em lesões estabelecidas (61). Entretanto, não foram encontrados dados suficientes para verificar essa hipótese (61).

A IL-10 exerce papel imunossupressor na PD, regulando a atividade de citocinas inflamatórias, como IL-1 e TNF- α , inibindo a atividade de MMPs e diferenciação de osteoclastos. Os Tregs surgem na presença de IL-10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , do inglês *Transforming Growth Factor Beta*) produzido por macrófagos e neutrófilos quando estimulados por patógenos(1). Esse subtipo celular regula ativação, proliferação e funções efetoras de outras células, principalmente Th1, suprimindo a resposta no início da infecção. Os Tregs expressam baixa quantidade de RANKL, e produzem grandes quantidades de IL-10, TGF- β e proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4, do inglês *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4*) que conferem efeito protetor à progressão da PD (35).

Além da ação direta que as células imunes inatas e adaptativas exercem, de forma indireta, essas células dão suporte ao sistema através da produção de fatores moleculares como as citocinas. As citocinas são glicoproteínas solúveis produzidas em resposta a infecção. Na PD TNF- α é produzido por linfócitos T ativos, monócitos/macrófagos e fibroblastos durante a inflamação. Suas funções são, aumento de moléculas de adesão, recrutamentos de leucócitos para o foco infeccioso, aumento de MMPs e citocinas pró inflamatórias e diferenciação de osteoclastos(62). A IL-1 α e IL-1 β , juntamente com seu receptor, ativam a via intracelular de transcrição de genes que ativam linfócitos e atraem células inatas. Além disso, IL-1 está

associada aos sintomas clínicos da PD, por meio da liberação de MMPs que degrada a matriz extracelular, formando a bolsa periodontal; e IL-1 β que aumenta a expressão de RANKL em osteoblastos e produção de PGE2 por osteoblastos e fibroblastos que estimula a reabsorção óssea via RANKL (63–65). Essas citocinas estão relacionadas com o agravamento dos sintomas da PD.

4. FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA PERIODONTITE

A PD é definida como “doença inflamatória crônica multifatorial associada com biofilme disbiótico e caracterizada pela destruição progressiva do aparato de inserção dental” (66). O termo “multifatorial” se refere à combinação de fatores que somados potencializam os resultados, ou seja, vários fatores são preditores do aparecimento e manutenção da doença.

O hábito de fumar é prejudicial para a saúde em qualquer situação e é considerado o fator de risco mais forte para incidência e progressão da PD (67). O uso dessa substância altera microbiota da cavidade oral, uma vez que, fumantes apresentam mais espécies patogênicas (68). Após o tratamento não cirúrgico, a cavidade oral de pacientes que cessaram o consumo de cigarro foi recolonizada por espécies não patogênicas (69). Estudos mostram que o tabagismo altera a resposta imunológica do hospedeiro. Os neutrófilos, uma das principais células envolvidas na PD, apresentam sua função e tempo de vida alterados (70,71). Os níveis de TNF- α , PGE2, MMP-8 e elastase de neutrófilos estavam aumentados em fumantes em relação a não fumantes (72). O consumo de cigarros pode alterar a regeneração dos tecidos afetados, inibindo a proliferação, quimiotaxia, e fixação de fibroblastos (73,74); a nicotina pode alterar e aumentar a produção de colágeno tipo I, aumentar atividade da collagenase, e inibir a fibronectina de forma dose-dependente (75). Além disso, o tabagismo é um fator epigenético e pode alterar estados de transcrição e metilação dos genes relacionados à organização da matriz extracelular (76).

As doenças sistêmicas contribuem no desenvolvimento da PD, e o diabetes e a PD possuem uma relação direta, já que as duas doenças interferem uma sobre a outra (77). Indivíduos com diabetes apresentam maior destruição dos tecidos periodontais, da mesma forma que indivíduos com periodontite apresentam perturbação no metabolismo de açúcares (77,78). Assim, indivíduos com diabetes tipo II apresentam maior prevalência e quadros clínicos graves de PD

com maior perda do osso de sustentação(79,80). O aumento sérico de IL-6 é tido como um fator de predisposição ao desenvolvimento do diabetes e está associado com a PD, na extensão da doença (81,82). O constante estado hiperglicêmico, além de contribuir para a destruição dos tecidos, interfere no processo de reparação. A síntese de novos fibroblastos gengivais é reduzida, resultando na perda de fibras periodontais e do osso alveolar, além de causar a morte de células produtoras de matriz extracelular e expressão diminuída de colágeno I e II (83,84).

Além de doenças sistêmicas, as doenças de comprometimento ósseo, como artrite reumatóide (AR) foram descritas como tendo associação com PD. Ambas as doenças compartilham mecanismos imunológicos, apresentando um perfil de citocinas semelhantes, com predomínio de IL-1 β , TNF- α e baixos níveis de IL-10 e TGF- β . Assim, parece que os sintomas das duas doenças advêm do desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias (85). A relação entre PD e RA pôde ser comprovada por um estudo piloto (86). Nesse estudo, a prevalência de PD moderada e severa foi maior em indivíduos com RA, da mesma forma que sujeitos PD apresentavam maior prevalência de RA. Além disso, *P. gingivalis* possuem uma enzima única *peptidylargininedeiminase* (PAD) que dá origem a antígenos que estão associados a inflamações tanto nas articulações quanto na gengiva(87).

O gênero também está relacionado com a suscetibilidade da PD. A prevalência de PD é mais alta em homens que mulheres, o que pode significar que o gênero masculino é fator de risco. Um estudo caso-controle demonstrou que indivíduos do sexo masculino apresentam maior suscetibilidade para o desenvolvimento da PD que mulher (10).Fatores hormonais, genéticos e epigenéticos podem estar envolvidos na suscetibilidade à PD(88,89). Apesar disso, acredita-se que a maior severidade da doença é reflexo da menor procura de serviços de saúde entre os homens e das piores práticas de higiene bucal (90). Um estudo prospectivo foi realizado e determinou-se que a remoção mecânica da placa reduz espontaneamente o quadro de gengivite e também a incidência, a severidade e a recorrência da periodontite(32).

Os fatores genéticos contribuem para a patogênese da PD (91). Estima-se que 50% das variações em características da PD podem ser explicadas por contribuições genéticas individuais (92). Tanto a interação entre vários produtos gênicos quanto com o ambiente afeta o início de progressão da doença. Com base nisso, vários genes foram apontados com caráter de proteção ou risco. Os SNPs em citocinas, quimiocinas, receptores ou moléculas são largamente analisadas em estudos caso-controle. Por exemplo, um estudo caso controle no gene *IL17A* (G197A, rs2275913) encontrou que o alelo A e o genótipo A/A foram associados à

suscetibilidade na periodontite crônica (8). Esses achados demonstram que mutações pontuais podem ter grande relevância na patogênese da PD.

5. CLASSIFICAÇÕES DA PERIODONTITE

Classificações são necessárias e se trata do ato de organizar categorias segundo sistema ou método, agrupando suas analogias e caracteres comum. No caso da PD, a categorização dos tipos clínicos da doença facilitou o estudo da etiologia, patogênese e tratamento. A patogênese da periodontite humana foi esquematizada pela primeira vez por Page e Schroeder(93). No Workshop de Classificação das Doenças Periodontais de 1999 as classificações das doenças periodontais foram realizadas com base nas diferentes apresentações clínicas da doença e definidas como: I) Doenças gengivais; II) Periodontites agressivas; III) Periodontites crônicas; IV) Periodontites que são manifestações de doenças sistêmicas; V) Doenças periodontais necrosantes; VI) Abscessos do periodonto; VII) Periodontites associadas a lesões endodônticas; e VIII) Deformidades e condições desenvolvidas ou adquiridas (94).

Dentre esses quadros clínicos, destacavam-se duas formas da doença: PD agressiva que acomete principalmente indivíduos jovens (<30 anos) apresentando progressão mais rápida com grande destruição de inserção periodontal(95) e a PD crônica que acomete principalmente adultos e idosos, apresentando uma progressão mais lenta e indolor(96). Ambas as formas, agressivas e crônicas eram, ainda, subdivididas quanto à extensão (localizada ou generalizada) e a severidade (leve, moderada e severa).

A classificação de 1999 foi largamente utilizada na prática clínica, porém o sistema apresentava algumas falhas, como falta de distinção clara baseada em patobiologia entre as categorias estipuladas, imprecisão no diagnóstico e dificuldades de implementação(97). Com base nisso, um novo sistema de classificação surgiu em 2017 para tentar superar essas dificuldades. O objetivo dessa nova classificação foi incorporar os novos conhecimentos adquiridos até o momento nas áreas de epidemiologia, etiologia, patogênese e propor uma nova estrutura de classificação(97). O Workshop Mundial de 2017 sobre a Classificação de Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantes estabeleceu a nova classificação como: I) Periodontites; II) Doenças periodontais necrosantes; III) Lesões endodônticas-periodontais; IV) Abscessos periodontais (66,98). Nesse novo sistema de classificação, as doenças previamente conhecidas como periodontites agressivas e crônicas, foram agrupadas em um único grupo

“periodontites”, pois não havia evidências fisiológicas e etiológicas que as sustentem a distinção. A PD é ainda subdividida em estágios (I a IV) e graus (A, B e C). O novo sistema de classificação da periodontite baseado nos estágios e graus da doença está contido nos quadros 1 e 2 nos anexos. Os estágios se referem a severidade da doença, bem como a complexidade durante o tratamento, e incluem uma descrição e distribuição da extensão da doença na dentição. Os graus fornecem informações suplementares sobre as características biológicas, incluindo uma análise baseada no histórico de progressão, risco de progressão adicional, desfechos ruins após o tratamento e avaliação do risco que a doença ou seu tratamento possam afetar negativamente a saúde geral do indivíduo (97).

6. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA PERIODONTITE

O diagnóstico da PD se inicia com a diferenciação do periodonto saudável do alterado. Mais do que isso, é preciso que o profissional seja capaz de diferenciar o periodonto alterado por condições alheias a periodontite, por exemplo, gengivite, lesões endodônticas, força oclusal traumática, próteses mal adaptadas, doenças sistêmicas (99). A partir disso, exames são baseados em observação macroscópicas, parâmetros clínicos e radiográficos. Os aspectos analisados são perda radiográfica do osso alveolar, aumento da profundidade de sondagem (PS), perda de inserção clínica (CAL, do inglês *ClinicalAttachmentLoss*), inflamação na gengiva medida como sangramento à sondagem (BoP, do inglês *BleedingonProbing*). A combinação desses parâmetros garante um diagnóstico correto(97,98).

Após o diagnóstico preciso da condição do paciente, se inicia o tratamento, que consiste basicamente em remover o biofilme bacteriano e/ou cálculo gengival e interromper o processo inflamatório no local. A remoção das bactérias no sulco gengival é feita por meio do debridamento mecânico da raiz do dente. Mesmo após a descontaminação é importante que o paciente mantenha boas práticas de higiene bucal, pois o acúmulo de bactérias no local leva a reincidência da doença(100). Em alguns casos, há a possibilidade de tratamento com antibióticos via oral ou tópico. Em algumas situações em que a terapia convencional não tem efeito esperado, considera-se o papel dos mediadores imunológicos, que inclui a neutralização de citocina inflamatórias, bloqueio de receptores de citocinas e ativação de vias de produção de citocinas anti-inflamatórias(101). Assim, a terapia anticitocinas parece ser promissora, porém são necessários mais estudos para avaliar a sua eficácia na PD.

7. IL-33 E ST2: FUNÇÕES E MECANISMOS BIOLÓGICOS

A interleucina 33, IL-33, é a mais recente citocina descoberta, e é considerada a 11ª membro da família das IL-1, que inclui IL-1 α , IL-1 β e IL-18. Descoberto por Schmitz e colaboradores (102), esse mediador é expresso constitutivamente e abundantemente principalmente em células residentes como fibroblastos, células endoteliais e epiteliais(103). Células epiteliais de tecidos de barreiras como queratinócitos da pele, células epiteliais do estômago ou glândulas salivares apresentam elevados níveis de expressão de IL-33 nuclear, já que o local é constantemente exposto ao ambiente e a substâncias danosas (103). Além dessas células, a IL-33 é expressa também em macrófagos, células dendríticas, células da musculatura lisa e osteoblastos(102,104). Mesmo durante a homeostase a IL-33 é abundantemente sintetizada e armazenada no núcleo das células produtoras. Porém, em caso de inflamação, sua expressão aumenta, podendo ser expressa por outros grupos de células (103,105).

A IL-33 quando presente no núcleo atua como fator nuclear endógeno, impedindo a transcrição de genes. O domínio nuclear N-terminal é capaz de se associar ao heterodímero H2A e H2B de histonas na superfície de nucleossomo ou ativar a histona desacetilase-3 (106). Ambos os processos levam a remodelação da cromatina. A manutenção da IL-33 no núcleo foi selecionada durante a evolução para regular a própria atividade pró-inflamatória (107).

A liberação de IL-33 do núcleo para o espaço extracelular não acontece pela via clássica, envolvendo o retículo endoplasmático/complexo de Golgi, como em outras proteínas. Fatores associados ao estresse celular (ATP extracelular e espécies reativas de oxigênio - ROS), sinais de injúria celular, lesão e necrose dos tecidos levam a secreção dessa proteína para o ambiente extracelular (108). Assim, IL-33 atua como *alarmin*, ou DAMP, emitindo um sinal de perigo endógeno para alertar outras células do sistema imunológico em caso de danos ao endotélio ou epitélio durante traumas ou infecções(103).

Por algum tempo, como em outros membros da família IL-1, acreditava-se que IL-33 era clivada por caspases 1 (102), porém, recentemente foi descoberto que a citocina nem mesmo tinha sítio para a clivagem desta enzima (109). Mesmo assim, IL-33 pode ser clivada pelas caspases 3 e -7 quando uma célula entra em estado apoptótico(109), levando a sua inativação. Outro mecanismo de regulação é a oxidação em quatro resíduos de cisteínas (Cys208/Cys227/Cys232/Cys259). Isso altera a conformação da proteína, devido a formação de pontes de dissulfeto, e assim, a IL-33 perde sua atividade biológica (110). Esse processo é rápido, então é provável que as primeiras horas ou minutos sejam cruciais (108). Essas etapas de

regulação são importantes para a manutenção da homeostase, pois IL-33 é expressa em altos níveis, sendo necessário limitar sua atividade na ausência de perigo, evitando inflamações descontroladas e letais.

O precursor pró-IL-33 é biologicamente ativo, porém quando clivado no domínio central por proteases inflamatórias produzidas por neutrófilos e mastócitos gera a forma madura da proteína (108). As formas maduras de IL-33 permanecem ativas e capazes de se ligar ao receptor ST2 e apresentam atividade aumentada em 10 a 30 vezes quando comparado com a pró-IL-33 em ensaios celulares (Figura 2). Isso sugere que a maturação proteolítica é uma etapa importante na regulação de suas atividades.

O receptor ST2, também chamado de IL1RL1 (receptor de interleucina 1 do tipo 1), pode ser expresso de diferentes formas dependendo do *splincing* sofrido pelo RNA mensageiro, resultando nas formas solúvel (sST2), transmembranar (ST2L) e variante (ST2V)(111,112). O sST2 compete com ST2L sequestrando IL-33 extracelular, assim, sST2 atua como chamariz, sendo um outro modulador da resposta inflamatória, uma vez que, altos níveis de sST2 pode inibir a ação de IL-33(113). Em caso de danos aos tecidos, IL-33 é liberada no espaço extracelular, onde se liga ao receptor ancorado à membrana, causando uma mudança conformacional que recruta a proteína acessória do receptor de interleucina e juntos formam um receptor completo. A transdução do sinal de IL-33 é dependente do seu receptor, uma vez que, em camundongos deficientes de ST2, observa-se quadros mais brandos de inflamação após a injeção de lipopolissacarídeo (LPS) (102).

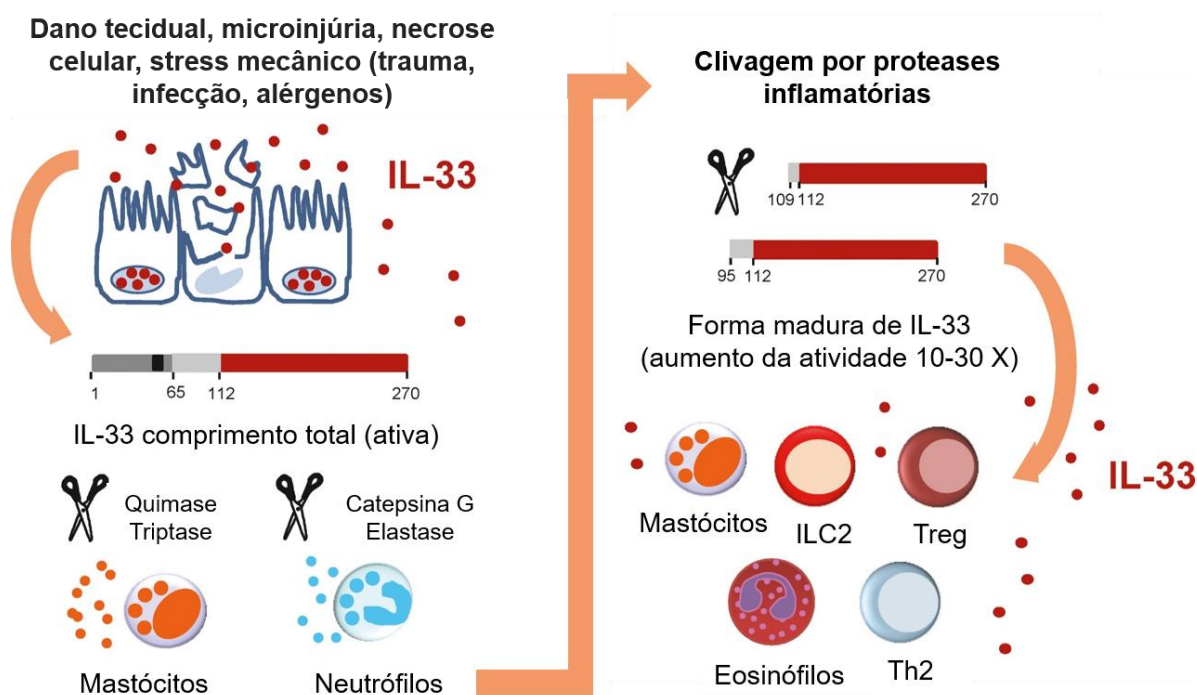


Figura 2: Liberação extracelular de IL-33 e ativação por proteases inflamatórias de mastócitos e neutrófilos. Após lesão ou necrose celular, a IL-33 é liberada dos núcleos das células produtoras como uma proteína precursora (pró-IL-33) com função biológica. Uma vez no espaço extracelular, IL-33 pode ser clivada por proteases de mastócitos e neutrófilos. Após sua clivagem, a IL-33 madura exibe 10 a 30 vezes mais atividade que pró-IL-33. ILC2: Célula linfóide inata tipo 2, Treg: Linfócitos T regulador, Th2: Célula T auxiliar tipo 2. **Fonte:** Adaptado de Cayrolet *et al.*, 2018 (108).

Após a formação do receptor, inicia-se a via de sinalização intracelular através do domínio do TIR (do inglês, *Toll-Interleukin-1 Receptor*) da proteína acessória (114,115). Isso leva o recrutamento de proteínas adaptadoras, como fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), quinases intracelulares associadas ao receptor de IL-1 (IRAK) - 1 e IRAK-4 e fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF-6). A partir disso, abre-se duas vias independentes, a primeira sinaliza a ativação do fator de transcrição da proteína ativadora 1 (AP-1) através das de MAPKs p38, como quinase c-Jun N-terminal (JNK) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK). A segunda via, leva a fosforilação e ativação de NF- κ B após a degradação da proteína inibitória I κ B. Ambas as vias resultam na transcrição de genes de citocinas e quimiocinas pró inflamatórias e, principalmente, citocinas associadas ao perfil Th2 de resposta (102,114,116,117). Além disso, estudos apontam que *Single Immunoglobulin IL-1 Receptor-Related Molecule* (SIGIRR) pode inibir a transdução do sinal através da ligação com o receptor transmembranar (118). A via IL-33/ST2 está esquematizada na figura 3.

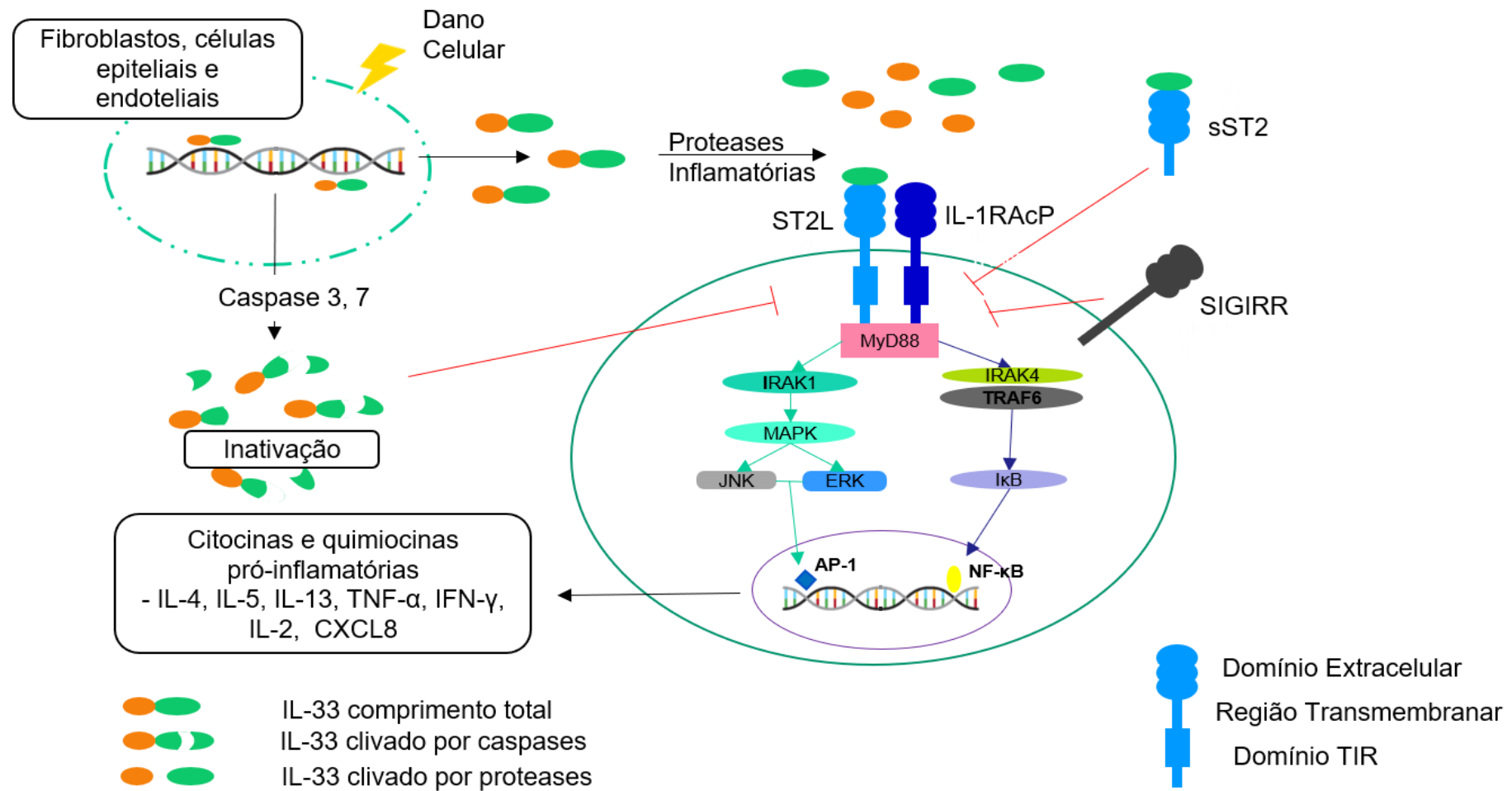


Figura 3: Via de sinalização intracelular IL-33/ST2, e seus mecanismos de regulação. IL-33 é produzida constitutivamente e armazenada em células endoteliais, epiteliais e fibroblastos. Nesse local, a citocina fica ligada ao DNA e atua como fator endógeno, regulando negativamente a expressão de genes. Em caso de sinal de apoptose, a IL-33 é clivada por caspases 3 ou 7 no domínio de citocina IL-1 C-terminal, e sua função biológica é perdida. Porém, em caso de dano celular, a citocina passa a atuar como *alarmin*, que é clivada por proteases inflamatórias. Após sua clivagem, IL-33 se liga ao receptor de membrana (ST2L) mais a proteína acessória (IL-1RAcP) e juntos ativam a via de sinalização intracelular, resultando na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. O receptor solúvel (sST2) e SIGIRR são antagonistas da via, o primeiro sequestra IL-33 disperso no meio; e o segundo se liga a ST2L e impede a transdução do sinal.

O receptor ST2 faz parte dos receptores da família IL-1. De forma semelhante a IL-33, a proteína é expressa constitutivamente na membrana plasmática de mastócitos, basófilos, neutrófilos, macrófago M2, células dendríticas, NK, linfócitos B e T (Th1, Th2, Treg), células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2), entre outras(108). Isso faz com que a via IL-33/ST2 desempenhe diversas funções dentro do sistema imunológico. A IL-33 pode atuar na tolerância imunológica, por meio da proliferação de Treg(119), e estimulando a produção de IL-2 por células dendríticas e mastócitos(120,121). Então, essa citocina causa expansão de linfócitos Treg de forma direta e indireta. Além disso, IL-33 pode expandir as populações de ILC2 e elevar a produção do fator de crescimento anfiregulina (AREG) por ILC2 e Treg que contribuem para a reparação dos tecidos lesionados, e regulação imunológica (122,123). Ainda, foi observado que as ILC2 quando ativadas por IL-33 produzem IL-13, citocina que direciona a diferenciação de macrófagos para o subtipo M2 (105).

Desde a descoberta, o eixo IL-33/ST2 foi associado ao perfil de resposta Th2. Células Th2, mastócitos, eosinófilos, basófilos, e ILC2 na presença de IL-33 apresentavam aumento da expressão de citocinas do perfil de resposta Th2, como IL-4, IL-5, IL-13, IL-6 (102,124–126). Ratos tratados com IL-33 intraperitoneal apresentavam quadros mais graves esplenomegalia com aumento de eosinófilos, células mononucleares e plasmócitos, mas não neutrófilos, acompanhado com o aumento de linfócitos e eosinófilos na corrente sanguínea. A avaliação dos níveis séricos de imunoglobulinas (Ig) mostrou aumento de IgE e IgA(102). Na presença de IL-33, o linfócito *Tnaive* altera o perfil de resposta e passam a expressar IL-5 e IL-13 independente de IL-4 (127). Chackerian e colaboradores (114) demonstraram que células Th2 respondem a IL-33 independente dos receptores de célula T, sugerindo que uma vez que a resposta Th2 é iniciada, IL-33 pode aumentar a resposta independente de antígenos.

Apesar de IL-33 ser fortemente relacionada com a resposta Th2, alguns trabalhos vêm demonstrando que a citocina pode alterar o padrão de resposta para o perfil Th1, com produção de INF- γ . Células NK e *Natural Killer T* (NKT) de fígado e baço na presença de IL-33 aumenta a expressão em duas vezes a produção de IL-4, e 30 vezes de INF- γ (128). Já em células T citotóxica 1 (TC1 do inglês, *Type 1 Cytotoxic T*) foi observado resultados semelhantes e sob influência de IL-12 houve aumento mais proeminente de INF- γ (129). Esses achados mostram a grande diversidade de função que IL-33/ST2 podem exercer dentro do sistema imunológico.

8. RELAÇÃO ENTRE O EIXO IL-33/ST2 E A PERIODONTITE

A PD é caracterizada por uma forte resposta inflamatória próximos ao sítio de infecção, causando danos às estruturas de proteção e sustentação dos dentes como gengiva, cemento, ligamento periodontal e, posteriormente, atinge o osso alveolar de suporte. Embora a presença de bactérias gram-negativas seja importante para a progressão da doença, apenas esses estímulos não desencadeiam a doença em si. Para isso várias células são recrutadas até o local, a produção de citocinas, quimiocinas moléculas de adesão se elevam, e mais células chegam até o local, instaurando um estado inflamatório na mucosa oral. Mastócitos e neutrófilos destroem as bactérias que estão tentando invadir os tecidos periodontais, ao mesmo tempo causam danos às células do hospedeiro, e produzem mediadores que atraem mais células para o local. As células dendríticas em constante monitoramento, ao encontrar antígenos mediam a apresentação aos linfócitos T e B que migram para o local, auxiliando no combate dos invasores diretamente ou produzindo mais mediadores. Todos esses elementos em conjunto alteram o microambiente da cavidade oral (16,35,130).

Nesse sentido, a IL-33 juntamente com seu receptor podem ser relevantes. Devido à grande destruição de células no local, processo necrótico e *stress* celular, a IL-33 armazenada principalmente em células endoteliais, epiteliais e fibroblastos, é liberada para o espaço extracelular. Nesse local, ocorre sua clivagem por proteases inflamatórias, potencializando sua ação pró-inflamatória(108). Nesse microambiente, mastócitos respondem prontamente a IL-33 devido a ligação com o receptor ST2, promovendo a sua maturação, adesão e sobrevivência. Estudos mostram que existe uma forte relação entre a severidade da PD com a degranulação de mastócitos (53). Além disso, induzem a produção de citocinas e quimiocinas que aumentam o recrutamento de neutrófilos, células NK, migração de células dendríticas e polarização de linfócitos T(131,132).

A IL-33 propaga sinais inflamatórios para mastócitos(133), basófilos (134), células dendríticas (135) e linfócitos Th2 (134), ou seja, a IL-33 pode atuar tanto na resposta imune inata quanto adaptativa. As células dendríticas ativadas pela exposição à IL-33 direcionam os linfócitos T *naive* para o subtipo Th2 (135). Além disso, IL-33 é um quimioatrativo para células Th2 e dirige a produção de citocinas do mesmo perfil como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13(136). Esses mediadores ativam a produção de anticorpos por linfócitos B que, posteriormente, se diferenciam em plasmócitos ainda mais eficientes (137,138). Os infiltrados celulares de lesão periodontais em estágios mais graves são dominados por linfócitos B e

plasmócitos(31,34),mostrando que pode haver uma correlação entre a resposta Th2 mediada pelo eixo IL-33/ST2 e a PD.

Nas células epiteliais da gengiva de pacientes com PD observa-se aumento de IL-33 e ST2 quando comparado com controles sem a doença. De forma semelhante, a presença de *P. gingivalis*, a principal bactéria relacionada com a PD, aumenta a síntese de IL-33 em tecidos periodontais de camundongos ou em ensaios *in vitro*(139,140). Esses dados nos mostram que bactérias periodontopatogênicas são capazes de modificar a expressão dessa proteína e, por consequência, alterar a resposta no local. Além disso, a IL-33 derivada de células epiteliais aumenta a inflamação mediada por citocinas Th2 em resposta a componentes bacterianos (141,142).

Outras citocinas que podem ser produzidas no decorrer da doença como IL-2, IL-4 e IFN- γ ainda não tiveram suas funções elucidadas, porém sabe-se que baixas concentrações contribuem para a progressão da PD (143). IL-1 β , IL-6 e TNF- α são responsáveis por recrutar outras células para o foco infeccioso, como neutrófilos, células dendríticas, monócitos, macrófagos etc.(130).Além disso, aumentam a reabsorção óssea de maneira direta (144,145) ou indiretamente pela indução RANKL e fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF, do inglês *MacrophageColony-Stimulating Factor*)(145,146).

A remodelação óssea é o sintoma que diferencia gengivite de PD, e estudos anteriores mostram que IL-33 desempenha papel durante a homeostase óssea(147). O processo de formação e reabsorção dos ossos ocorre em equilíbrio e qualquer perturbação pode ser danosa. Esse processo é orquestrado por osteoblastos, osteócitos e osteoclastos que, por sua vez, são influenciados por mediadores químicos como hormônios e citocinas. Células osteoprogenitoras sob a influência de fator inibidor de leucemia (LIF, do inglês *LeukemiaInhibitoryfactor*), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs, do inglês *FibroblastGrowthFactors*), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês *PlateletDerivedGrowthFactors*) e TGF- β , induzem a formação de osteoblastos e, posteriormente, osteócitos (148). Porém, na presença de IL-1, IL-6, IL-33, TNF- α , M-CSF e RANKL a diferenciação é direcionada para a formação de osteoclastos, favorecendo a reabsorção dos componentes da matriz óssea (148,149).

A fim de testar os efeitos de IL-33 sobre a osteoclastogênese, Mun e colaboradores (150) incubaram monócitos CD14⁺ que expressavam ST2 na presença de IL-33/M-CSF ou RANKL/M-CSF. Os resultados mostram que a diferenciação de monócitos para osteoclastos acontece diante de estímulos de IL-33 através do receptor ST2, devido ao aumento de fatores

de maturação de osteoclastos, como Fator 6 associado ao receptor TNF- α (TRAF6, do inglês *TNF- α Receptor Associated Factor 6*), fator nuclear das células T citoplasmáticas 1 ativadas (NFATc1, do inglês *nuclear factor of activated T cell cytoplasmic 1*), c-Fos, e Syk. Ainda, observaram que a destruição óssea acontece de forma dose dependente de IL-33, e os efeitos foram suprimidos na presença de anticorpo anti-ST2. Além disso, em modelo animal de indução da PD por ligadura, observa-se aumento de IL-33, bem como, do número de mastócitos e na expressão de RANKL (151). Apesar disso, ainda não há consenso sobre o efeito da IL-33 na reabsorção óssea. Em estudos *in vitro*, a IL-33 foi relatada inibindo a diferenciação de osteoclastos(104,152,153) ou aumentando a formação de osteoblastos(153).

Mesmo assim, estudos mostram uma forte correlação entre os níveis séricos de IL-33 com a erosão na superfície de ossos em pacientes com artrite reumatoide (RA) (154). Em modelo animal de artrite induzida por antígenos, foi observado a piora do prognóstico da doença, devido a ativação de mastócitos dirigidos por IL-33 (155), porém o bloqueio do receptor ST2 tem efeito protetivo (156). Isso sugere que IL-33 e ST2 são codependentes. Pensando nisso, o bloqueio ou supressão do receptor pode modificar os efeitos de IL-33. Martin e colaboradores demonstraram que a supressão de ST2 em ratos *knock-out* atenuou os sintomas de artrite (157); bem como a ligação de IL-33 com o receptor antagonista sST2 (158). Em ambos os casos, o efeito de IL-33 sobre a remodelação óssea foi suavizado, mostrando que essa pode ser uma possibilidade terapêutica para outras doenças com comprometimento ósseo. Assim, podemos hipotetizar que a diminuição de IL-33 e ST2L com aumento de sST2 pode ter efeito protetivo sobre a periodontite, assim como foi observado para artrite.

Observações feitas em pacientes com PD mostram uma incompatibilidade entre os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e reabsorção óssea. Essas inconstâncias não podem ser explicadas pela presença de bactérias periodontopatogênicas. Assim, Hienz e colaboradores(143) sugeriram que variações na composição genética, principalmente, em genes que regulam a atividade imunológica e inflamatória poderia explicar essas discrepâncias. Pensando nisso, mutações que afetam a quantidade de IL-33 ou de seu receptor podem influenciar no processo de reabsorção óssea, já que a via IL-33/ST2 favorece uma resposta Th2 e age sobre a homeostase óssea.

9. POLIMORFISMOS EM *IL33* E *IL1RL1* E A RELAÇÃO COM A PERIODONTITE

A IL-33 é codificada pelo gene de igual nome localizado no cromossomo 9p24.1. O gene é composto por 8 *exons*, sendo que o primeiro não é traduzido. O principal promotor está localizado a montante do *exon* 1a, cerca de 25,8 Kb do *exon* 2. Um segundo promotor é observado a 4,6 Kb a partir do *exon* 2 (Figura 4A). Os locais do início da transcrição estão a jusante da região *TATA BOX* em ambos os promotores(107,108).

A proteína codificada pelo gene *IL33* conta com três domínios (figura 4B). O domínio N-terminal da proteína contém o motivo de ligação a cromatina (159) e sinal de localização nuclear (160), que é responsável pela ligação da IL-33 as histonas e outras porções da cromatina, fazendo com que essa proteína atue como fator de transcrição (106). O domínio central abrange em sua estrutura sítios de clivagem para proteases inflamatórias, que garante maior atividade biológica para a citocina(108,161,162).O domínio de citocina tipo IL-1 na porção C-terminal contém locais para a clivagem por caspases 3 e 7 (108)e para interação entre IL-33 e ST2. A interação entre citocina e receptor se dá através de dois sítios, o sítio 1 da citocina exibe grande carga negativa, ao passo que a superfície de contato com ST2 é dominada por cargas positiva. o sítio 2 apresenta resíduos ácidos que formam pontes salinas com o agrupamento hidrofóbico do receptor (163). A clivagem de IL-33 por caspases durante processo apoptótico leva a inativação da proteína, já que IL-33 não pode mais ser reconhecida pelo seu receptor após a clivagem.

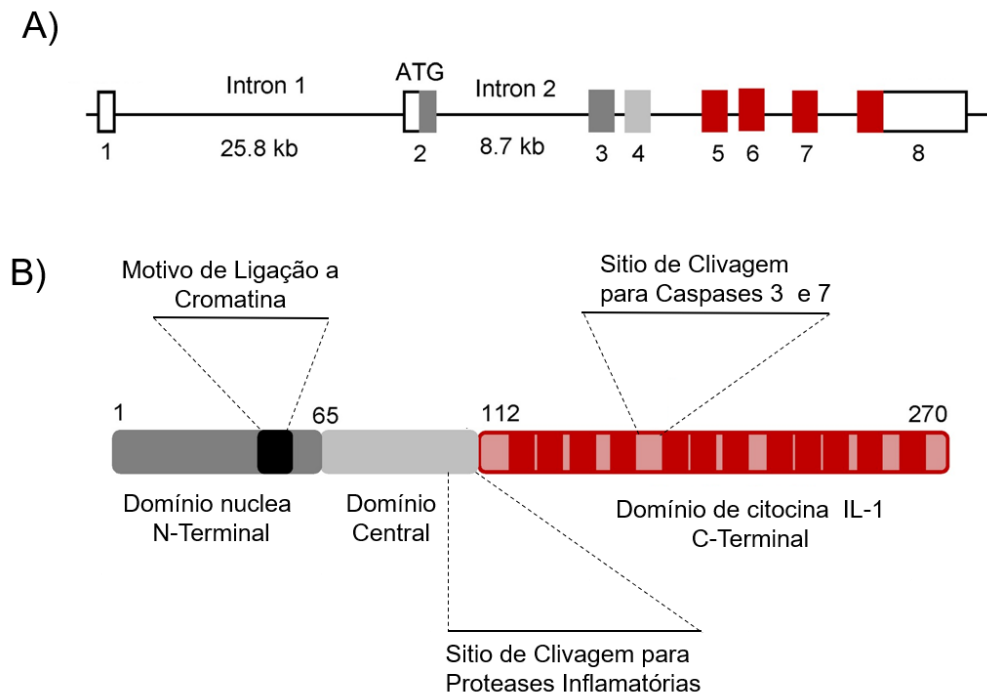


Figura 4: O gene e a proteína da IL-33 humana. (A) Estrutura do gene IL33. O gene se estende por > 42 kb, contém 8 exons e está localizado no cromossomo 9 em 9p24.1. O exon 1 (também designado exon 1a) está localizado 25,8 kb a montante do exon 2. Um exon 1b alternativo, localizado 4,6 kb a montante do exon 2 também foi descrito. (B) Estrutura primária da proteína IL-33 humana. Os diferentes domínios de proteína são indicados e os locais de clivagem para proteases envolvidas na ativação de IL-33 (proteases inflamatórias) ou inativação (caspases) são mostrados acima da estrutura primária. **Fonte:** Adaptado de Cayrol e Girard, 2018(108).

O receptor de IL-33, chamado de ST2, é codificado pelo gene *IL1RL1*, localizado no 2q12.1. É composto por 11 exons sendo que o primeiro não é traduzido; e duas regiões promotoras distintas (Figura 5A). As diferentes combinações entre exons e o promotor distal ou proximal resulta em duas isoformas do receptor, a forma transmembranar (ST2L) e a forma solúvel (sST2) (111). O promotor distal dirige a produção de ST2L e sST2; enquanto o promotor proximal é exclusivo para sST2. Os exons 2 a 8a são compartilhados pelas duas formas proteicas. Esses exons codificam o domínio extracelular do receptor, local de interação com IL-33. O exon 8b é exclusivo para sST2, os exons 9 a 11 são exclusivos de ST2L. O exon 9 codifica a região transmembrana, que é responsável pela ancoragem do receptor na membrana plasmática das células produtoras; os exons 10 e 11 compreendem o domínio TIR, responsável pela sinalização da via intracelular que culmina na produção de mediadores inflamatórios. O *splicing* alternativo sofrido por sST2, com a exclusão dos exons 9 a 11, explica porque essa forma é o antagonista natural de ST2L, já que quando IL-33 se liga ao receptor na forma solúvel, a transdução do sinal em direção ao núcleo da célula não acontece(164–166). As três variantes

de transcrição do RNA mensageiro formados pelos devido *splicing* alternativo no gene está contido na figura 5B.

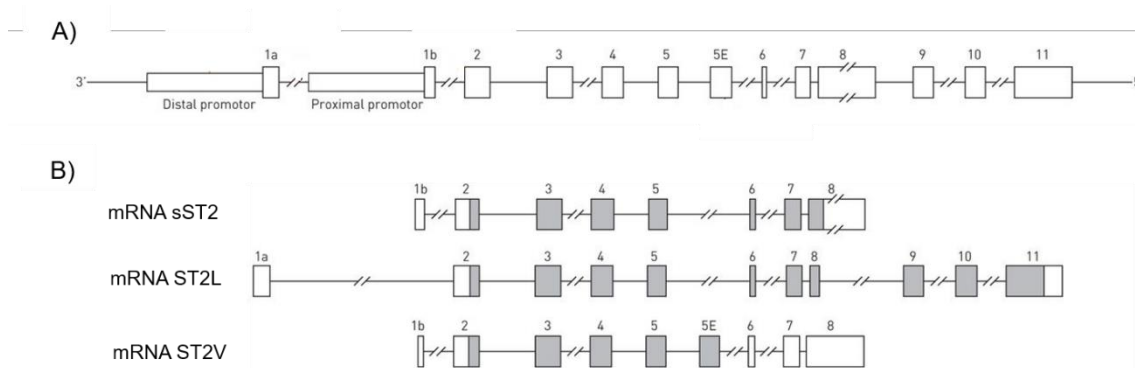


Figura 5: Gene *IL1RL1* e os RNAs mensageiros formados por diferentes *splicing* alternativos. (A) Estrutura do gene de *IL1RL1*, localizado no cromossomo 2q12.1, é composto por dois promotores e 11 exons. (B) RNAs mensageiros formados por *splicing* alternativo no gene. As diferentes combinações, formam a proteína solúvel (sST2), transmembranar (ST2L) e variante (ST2V). Os exons estão numerados; as partes pintadas em cinza correspondem às regiões transcritas dentro dos exons. **Fonte:** Adaptado de Dijk, *et al.*, 2018 (166).

A nível proteico, ST2L é composto por três domínios extracelulares do tipo imunoglobulinas, uma região transmembranar, e um domínio TIR. sST2 é secretado como uma proteína não glicosilada, contém os domínios extracelular compartilhados por ST2L, porém sem a porção de ancoragem à membrana e com nove aminoácidos na porção C-terminal (167). Posteriormente, foram descobertas outras duas variantes de transcrição, ST2V e ST2LV. Um *exon* extra (5E) com 170 pb é observado para ST2V, levando a introdução de uma nova cadeia hidrofóbica e perda do terceiro motivo do tipo imunoglobulinas, devido a formação precoce de um códon de parada (112,166). ST2LV é produzido quando há um *splicing* alternativo em ST2L, porém é observado apenas em galinhas (168).

A resposta imunológica individual dos pacientes acometidos com PD é crucial para determinar os sintomas clínicos, uma vez que, a maior causa de dano tecidual é oriundo de uma resposta inflamatória exacerbada (29,30). Em contrapartida, uma resposta ineficiente pode não ser o suficiente para eliminar as bactérias periodontopatogênicas. Assim, uma resposta equilibrada é essencial para eliminar o patógeno sem causar danos desnecessários (1). O controle dessa resposta é mediado por citocinas e quimiocinas, que são produzidas a partir a transcrição de genes. Pensando nisso, polimorfismos nos genes podem alterar a quantidade e qualidade da proteína expressa dependendo do local onde a mutação se encontra. Mutações em regiões codificantes, como *exons*, altera a estrutura da proteína expressa, devido a troca de

aminoácidos inseridos na proteína após a etapa de processamento do RNA. As alterações em regiões promotoras de genes, ou em *introns*, causam alterações na quantidade da proteína expressa, devido a alterações químicas e físicas dos locais de ligação a fatores de transcrição, desregulando a transcrição de genes (169). Desta forma, os SNPs podem afetar a maneira como um indivíduo responde ao meio ambiente e podem modificar o risco às doenças (4).

Os SNPs são os polimorfismos mais frequentes dentro do genoma humano e podem ser associados ao risco ou proteção para o desenvolvimento de doenças. A PD é tida como multifatorial, já que vários fatores externos podem influenciar sua patologia. Assim, não é incomum pensar que polimorfismos genéticos podem estar associados a fisiopatologia da doença(8,170). Então, mutações dentro dos genes de citocinas e seus receptores, como IL-33 e ST2, podem mostrar associações com a PD.

No gene *IL33* foram identificados SNPs candidatos a marcadores de risco no desenvolvimento de doenças como asma (171), doenças inflamatórias intestinais(172), Alzheimer (173,174), doenças alérgicas(175), doenças autoimunes (176) e câncer (177). Um deles é o SNP *rs1929992 T>C*, que está localizado no *intron 3* e é caracterizado pela troca de uma timina por uma citosina. A consequência da troca é a diminuição da proteína produzida. Estudos mostram que o alelo T ou genótipo T/T aumenta a expressão de IL-33 quando comparada com os indivíduos portadores do alelo C ou genótipo C/C (178). O *rs7025417 T>C*, outra variante transcricional do gene *IL33*, está localizado em sua região promotora, definido pela troca de timina por citosina. Tu e colaboradores(179) demonstram que células transfectadas com plasmídeos contendo alelo T apresentavam duas vezes maior atividade da luciferase que o alelo T, e esses resultados foram confirmados observando os níveis séricos de IL-33, o qual o alelo T leva a maior produção da citocina em comparação ao alelo C.

Da mesma forma que polimorfismos em *IL33* foram identificadas mudanças no gene *IL1RL1* que podem alterar a resposta de um sujeito(180,181). Assim, o *rs3821204 C>G* encontrado na região *untranslated 3'* é caracterizado pela troca de citosina por uma guanina. Tanto o alelo C quanto o genótipo C/C aumentam a expressão da forma solúvel do receptor, na produção de RNA mensageiro e a nível proteico (182,183). o *rs11695424 G>A*, troca de guanina por adenina na região promotora também altera a expressão da sST2. Células transfectadas com plasmídeos contendo alelo G apresentavam quatro vezes mais atividade da luciferase para o alelo A, ou seja, o alelo selvagem expressa mais moléculas de sST2 que o mutado (179).

Sabe-se as lesões mais graves na periodontite é decorrente de uma resposta inata forte e predomínio de uma resposta Th2, com aumento de linfócitos B e plasmócitos(31) e que fatores inerentes ao hospedeiro, como fatores genéticos, podem influenciar sua fisiopatologia (91). Ainda é conhecido que o eixo IL-33/ST2 está principalmente relacionado com aumento da contagem de mastócitos e a produção de citocinas tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13 e aumento de imunoglobulinas séricas (102), além de estar relacionado com o processo de reabsorção óssea (147). Desse modo, mutações que afetam a quantidade de proteínas produzidas podem deslocar o equilíbrio para proteção ou risco para o desenvolvimento da doença. Por exemplo, o aumento de IL-33 somado ao aumento de ST2 pode conferir um *status* de risco.

10. JUSTIFICATIVA

As doenças periodontais são as doenças bucais mais comuns do mundo, afetando até 90% da população mundial (29), sendo que aproximadamente 10 a 15% dos indivíduos com a doença desenvolvem formas severas e destrutivas(184).

A grande complexidade que existe entre as células e mediadores químicos envolvidos, mais os fatores externos que modificam a resposta do hospedeiro são grandes dificultadores para compreensão total da doença. Pequenas alterações no genoma podem estar diretamente associadas aos diferentes padrões de resposta encontrada em cada indivíduo, uma vez que, cada um apresenta uma combinação única nas variantes (SNPs) dentro dos genes. Assim, estudos que permitem determinar quais as consequências dessas mudanças, tanto na qualidade quanto na quantidade, podem contribuir para compreensão da imunopatologia da PD.

A IL-33 juntamente com o seu receptor, ST2, foram associados a doenças de comprometimento ósseo, como osteossarcoma, artrite reumatoide e osteoporose (185–187), que compartilham várias características em comum com PD. O eixo IL-33/ST2 está relacionado com amplificação da resposta tipo Th2, a principal resposta da PD em lesões avançadas, com grandes infiltrados de linfócitos B e plasmócitos. Além disso, vários estudos mostram uma relação positiva entre a reabsorção óssea e IL-33 (147). Ou seja, há estudos que mostram que a presença de IL-33 é acompanhada de maiores taxas de reabsorção óssea, um dos sintomas característicos de PD. Apesar disso, ainda não se tem consenso sobre esses achados, e alguns autores apontam dados conflitantes (104).

Os SNPs que foram avaliados nesse trabalho alteram a quantidade de IL-33 e sST2 e, até onde vai nosso conhecimento, poucos trabalhos foram descritos relacionando esses polimorfismos com a PD. Dessa forma, realizar estudos relacionando os componentes genéticos com a resposta imunológica frente à PD contribuirá para melhor esclarecer seus mecanismos imunopatogênicos, auxiliando no diagnóstico e prognóstico da doença. Portanto, compreender estes fatores e correlacionar com a progressão da PD é fundamental para entendê-la.

11. OBJETIVOS

11.1 Geral

Este estudo teve como objetivo avaliar a influência de polimorfismos nos genes *IL33* e seu receptor *IL1RL1* na patogênese da periodontite em pacientes com PD na região norte/nordeste do Paraná. Somado a isso, o presente estudo objetivou quantificar os níveis séricos de IL-33 e avaliar a correlação entre os genótipos e a produção da citocina.

11.2 Específicos

- Padronizar a técnica de PCR-SSP para a detecção dos polimorfismos nos genes de *IL33* e seu receptor *IL1RL1*;
- Identificar os alelos e genótipos dos genes *IL33* (*rs1929992 T>C* e *rs7025417 T>C*) e *IL1RL1* (*rs3821204 C>G* e *rs11685424 G>A*) em pacientes com PD e controles fumantes e não fumantes;
- Determinar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas para esses polimorfismos em pacientes com PD e controles fumantes e não fumantes;
- Avaliar a associação entre os SNPs dos genes *IL33* e *IL1RL1* e a imunopatogênese da PD em um estudo caso-controle por meio de uma análise estatística adequada;
- Determinar a concentração de citocina IL-33 no soro de pacientes e controles não fumantes e comparar com outros estudos semelhantes;
- Avaliar uma possível correlação entre os genótipos e a produção das citocinas nos pacientes com PD.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
2. Consortium IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931–45.
3. Chanock S. Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease. *Dis Markers*. 2001;17(2):89–98.
4. Chorley BN, Wang X, Campbell MR, Pittamn GS, Nouredine MA, Bell, Douglas A. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing technologies. *Mutat Res*. 2008;659(1–2):147–57.
5. Lin H, Gong Y-Z. Association of HLA-B27 with ankylosing spondylitis and clinical features of the HLA-B27-associated ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2017;37(8):1267–80.
6. Dashti N, Mahmoudi M, Aslani S, Jamshidi A. HLA-B * 27 subtypes and their implications in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Gene*. 2018;670:15–21.
7. Rosenberg NA, Huang L, Jewett EM, Szpiech ZA, Jankovic I, Boehnke M. Genome-wide association studies in diverse populations. *Nat Rev Genet*. 2010;11(5):356–66.
8. Zacarias JMV, Sippert EÂ, Tsuneto PY, Visentainer JEL, e Silva CDO, Sell AM. The influence of interleukin 17A and IL17F polymorphisms on chronic periodontitis disease in Brazilian patients. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:11–3.
9. Brodzikowska A, Górska R, Kowalski J. Interleukin-1 Genotype in Periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2019;67(6):367–73.
10. de Alencar JB, Zacarias JMV, Tsuneto PY, de Souza VH, de Oliveira E Silva C, Visentainer JEL, et al. Influence of inflammasome NLRP3, and IL1B and IL2 gene polymorphisms in periodontitis susceptibility. *PLoS One*. 2020;15(1):1–17.
11. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent JRL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134–44.
12. American Academy of Periodontology. The Pathogenesis of Periodontal Diseases. *J Periodontol*. 1999;70:457–70.
13. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):1–6.
14. Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens

- worldwide. *J Clin Periodontol*. 2008;35(8):346–61.
15. Palma P V, Leite ICG. Epidemiology and social inequalities of periodontal disease in Brazil. *Front Public Heal*. 2014;2:1–3.
 16. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 4th ed. Rio de Janeiro: Ed. Ganabara Koogan; 2005.
 17. Marsh PD, Lewis MAO, Rogers H, Williams DW, Wilson M. Marsh & Martin Oral Microbiology. 6th ed. فصل نامه علمی پژوهشی آموزش عالی ایران، سال هشتم، شماره چهارم، زمستان 1395. Elsevier; 2016.
 18. Pérez-Chaparro PJ, Gonçalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Lobão E, Tamashiro N, et al. Associated with Periodontitis: A systematic review. *J Dent Res*. 2014;93(9):846–58.
 19. Socransky, Sigmund S., Haffajee A. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005;38:135–87.
 20. Van Winkelhoff AJ, Loos BG, Van Der Reijden WA, Van Der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol*. 2002;29(11):1023–8.
 21. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and Its Relationship to Initiation of Localized Aggressive Periodontitis: Longitudinal Cohort Study of Initially Healthy Adolescents. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):3859–69.
 22. Carranza FA, Camargo PM. The Periodontal Pocket. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA, editors. *Carranza's Clinical Periodontology*. 11th ed. Los Angeles: Elsevier Saunders; 2012.
 23. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000. 1997;14:9–11.
 24. Irshad M. In Vitro Invasion and Survival of *Porphyromonas gingivalis* in Gingival Fibroblasts ; Role of the Capsule. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2012;60(6):469–76.
 25. Handfield M, Mans JJ, Zheng G, Lopez MC, Mao S, Progulske-Fox A, et al. Distinct transcriptional profiles characterize oral epithelium-microbiota interactions. *Cell Microbiol*. 2005;7(6):811–23.
 26. Novak N, Haberstick J, Bieber T, Allam JP. The immune privilege of the oral mucosa. *Trends Mol Med*. 2008;14(5):191–8.

27. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):3944–55.
28. Socransky SS, Haffajee AD. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. *J Periodontol.* 1992;63(4s):322–31.
29. Pihlstrom B, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal Diseases. *Lancet.* 2005;366(9499):1809–20.
30. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med.* 2013;15:1–22.
31. Seymour GJ, Powell RN, Davies WL. Conversion of a stable T-cell lesion to a progressive B-cell lesion in the pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: an hypothesis. *J Clin Periodontol.* 1979;6(5):267–77.
32. Axelsson P, Nyström B, Lindhe J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults: Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol.* 2004;31(9):749–57.
33. Lindhe J, Liljenberg B, Listgarten M. Some Microbiological and Histopathological Features of Periodontal Disease in Man. *J Periodontol.* 1980;51(5):264–9.
34. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2004;35:21–41.
35. Sell AM, de Alencar JB, Visentainer JEL, e Silva C de O. Immunopathogenesis of Chronic Periodontitis. In: Arjunan P, editor. *Periodontitis - A Useful Reference.* Intech Open; 2017. p. 143–67.
36. Weinmann JP. Progress of Gingival Inflammation into the Supporting Structures of the Teeth. *J Periodontol.* 1941;12(2):71–82.
37. Ooya K, Yamamoto H. A scanning electron microscopic study of the destruction of human alveolar crest in periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1978;13(6):498–503.
38. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997;14(1):158–72.
39. Benedetto A Di, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: Linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:1–7.
40. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med.* 2003;11(1):17–21.

41. Da Luz FAC, Oliveira APL, Borges D, Brígido PC, Silva MJB. The Physiopathological Role of IL-33: New highlights in bone biology and a Proposed Role in Periodontal Disease. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:1–8.
42. Carranza FA, Camargo PM, Takei HH. Perda Óssea e Padrões de Destruição Óssea. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA, editors. *Carranza Periodontia Clínica*. 11th ed. Rio de Janeiro: Elsevier Saunders; 2012.
43. Baek KJ, Choi Y, Ji S. Gingival fibroblasts from periodontitis patients exhibit inflammatory characteristics in vitro. *Arch Oral Biol.* 2013;58(10):1282–92.
44. Bloemen V, Schoenmaker T, de Vries TJ, Everts V. Direct Cell-Cell Contact Between Periodontal Ligament Fibroblasts and Osteoclast Precursors Synergistically Increases the Expression of Genes Related to Osteoclastogenesis. *J Cell Physiol.* 2010;222(3):565–73.
45. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms tissue matrix of connective destruction i n periodontitis. *Periodontology 2000.* 1997;14:144–57.
46. Dennison DK, Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol 2000.* 1997;14(1):54–78.
47. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(3):329–55.
48. Abraham SN, St. John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(6):440–52.
49. Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol.* 2006;315:13–34.
50. McAlpine SM, Enoksson M, Lunderius-Andersson C, Nilsson G. The Effect of Bacterial, Viral and Fungal Infection on Mast Cell Reactivity in the Allergic Setting. *J Innate Immun.* 2011;3(2):120–30.
51. Batista AC, Rodini CO, Lara VS. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. *Oral Dis.* 2005;11(4):249–54.
52. Steinsvoll S, Helgeland K, Schenck K. Mast cells - A role in periodontal diseases? *J Clin Periodontol.* 2004;31(6):413–9.
53. Huang S, Lu F, Chen Y, Huang B, Liu M. Mast Cell Degranulation in Human Periodontitis. *J Periodontol.* 2013;84(2):248–55.
54. Fitzpatrick LA, Buzas E, Gagne TJ, Nagy A, Horvath C, Ferencz V, et al. Targeted

- deletion of histidine decarboxylase gene in mice increases bone formation and protects against ovariectomy-induced bone loss. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(10):6027–32.
55. Dobigny C, Saffar J. H1 and H2 Histamine Receptors Modulate Osteoclastic Resorption by Different Pathways: Evidence Obtained by Using Receptor Antagonists in a Rat Synchronized Resorption Model. *J Cell Physiol.* 1997;173(1):10–8.
 56. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. The role of T cells in periodontal disease: Homeostasis and autoimmunity. *Periodontol 2000.* 2007;43(1):14–40.
 57. Azuma M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontal Res.* 2006;41(5):361–73.
 58. Teng YAT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest.* 2000 Sep;106(6):59–67.
 59. Yun PLW, Decarlo AA, Collyer C, Hunter N. Hydrolysis of Interleukin-12 by *Porphyromonas gingivalis* Major Cysteine Proteinases May Affect Local Gamma Interferon Accumulation and the Th1 or Th2 T-Cell Phenotype in Periodontitis. *Infect Immun.* 2001;69(9):5650–60.
 60. Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 2009 Apr;21(2):146–52.
 61. Arun K V, Talwar A, Kumar TSS. T-helper cells in the etiopathogenesis of periodontal disease: A mini review. *J Indian Soc Periodontol.* 2011 Jan;15(1):4–10.
 62. Idriss HT, Naismith JH. TNF α and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s). *Microsc Res Tech.* 2000;50(3):184–95.
 63. Liu Y-CG, Lerner UH, Teng Y-TA. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000.* 2000;52(1):163–206.
 64. Gupta G. Gingival crevicular fluid as a periodontal diagnostic indicator- II: Inflammatory mediators, host-response modifiers and chair side diagnostic aids. *J Med Life.* 2013;6(1):7–13.
 65. O'Neill LA. J. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 Years of progress. *Immunol Rev.* 2008;226(1):10–8.
 66. STEFFENS JP, MARCANTONIO RAC. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. *Rev Odontol da UNESP.* 2018;47(4):189–97.
 67. Walter C, Kaye EK, Dietrich T. Active and passive smoking: Assessment issues in

- periodontal research. *Periodontol* 2000. 2012;58(1):84–92.
68. Zambon JJ, Grossi SG, Machtei EE, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. Cigarette Smoking Increases the Risk for Subgingival Infection With Periodontal Pathogens. *J Periodontol*. 1996;67(10s):1050–4.
 69. Delima SL, McBride RK, Preshaw PM, Heasman PA, Kumar PS. Response of subgingival bacteria to smoking cessation. *J Clin Microbiol*. 2010;48(7):2344–9.
 70. Pabst MJ, Pabst KM, Collier JA, Coleman TC, Lemons-Prince ML, Godat MS, et al. Inhibition of Neutrophil and Monocyte Defensive Functions by Nicotine. *J Periodontol*. 1995;66(12):1047–55.
 71. Soder B, Nedlich U, Jin LJ. Longitudinal Effect of Non-Surgical Treatment and Systemic Metronidazole for 1 week in Smokers and Non Smokers With Refractory Periodontitis : a 5 year study. *J Periodontol*. 1999;70(7):761–71.
 72. Söder B. Neutrophil elastase activity, levels of prostaglandin E2, and matrix metalloproteinase-8 in refractory periodontitis sites in smokers and non-smokers. *Acta Odontol Scand*. 1999;57(2):77–82.
 73. James JA, Sayers NM, Drucker DB, Hull PS. Effects of Tobacco Products on the Attachment and Growth of Periodontal Ligament Fibroblasts. *J Periodontol*. 1999;70(5):518–25.
 74. Cuff MJA, McQuade MJ, Scheidt MJ, Sutherland DE, Van Dyke TE. The Presence of Nicotine on Root Surfaces of Periodontally Diseased Teeth in Smokers. *J Periodontol*. 1989;60(10):564–9.
 75. Chahal G, Chhina K, Chhabra V, Chahal A. Smoking and its Effect on Periodontium – Revisited Gurparkash. *Indian J Dent Sci*. 2017;9(1):44–51.
 76. Cho YD, Kim PJ, Kim HG, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, et al. Transcriptomics and methylomics in chronic periodontitis with tobacco use: a pilot study. *Clin Epigenetics*. 2017;9(1):81.
 77. Taylor GW. Bidirectional Interrelationships Between Diabetes and Periodontal Diseases: An Epidemiologic Perspective. *Ann Periodontol*. 2001;6(1):99–112.
 78. Soskolne AW, Klinger A. The relationship Between Periodontal Diseases and Diabetes: An overview. *Ann Periodontol*. 2001;6(1):91–8.
 79. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M. Glycemic Control and Alveolar Bone Loss Progression in Type 2 Diabetes. *Ann Periodontol*. 1998;3(1):30–9.
 80. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal Disease in Non-Insulin-Dependent

- Diabetes Mellitus. *J Periodontol*. 1991;62(2):123–31.
81. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. 2004;25(1):4–7.
 82. Loos BG. Systemic Markers of Inflammation in Periodontitis. *J Periodontol*. 2005;76(11-s):2106–15.
 83. Liu R, Desta T, He H, Graves DT. Diabetes Alters the Response to Bacteria by Enhancing fibroblast Apoptosis. *Endocrinology*. 2004;145(6):2997–3003.
 84. Kiran M, Arpak N, Ünsal E, Erdoğan MF. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 2005;32(3):266–72.
 85. Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR. Periodontitis and Rheumatoid Arthritis – A Review. 2005;76(11s):2066–74.
 86. Mercado F, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Is there a relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease? *J Clin Periodontol*. 2000;27(4):267–72.
 87. Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ, Weissmann G. Hypothesis: The Humoral Immune Response to Oral Bacteria Provides a Stimulus for the Development of Rheumatoid Arthritis. *Inflammation*. 2004;28(6):311–8.
 88. Shiau HJ, Reynolds MA. Sex Differences in Destructive Periodontal Disease: A Systematic Review. *J Periodontol*. 2010;81(10):1379–89.
 89. Güncü GN, Tözüm TF, Çağlayan F. Effects of endogenous sex hormones on the periodontium - Review of literature. *Aust Dent J*. 2005;50(3):138–45.
 90. MACHION L, de FREITAS PM, CESAR NETO JB, NOGUEIRA FILHO GR, NOCITI Jr. FH. A influência do sexo e da idade na prevalência de bolsas periodontais. *Pesqui Odontológica Bras*. 2000;14(1):33–7.
 91. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2013;62(1):59–94.
 92. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, et al. Evidence of a Substantial Genetic Basis for Risk of Adult Periodontitis. *J Periodontol*. 2000;71(11):1699–707.
 93. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976;34(3):235–49.
 94. Wiebe CB, Putnins EE. The periodontal disease classification system of the American

- Academy of Periodontology - An update. *J Can Dent Assoc (Tor)*. 2000;66(11):594–7.
95. Albandar JM. Aggressive periodontitis: Case definition and diagnostic criteria. *Periodontol 2000*. 2014;65(1):13–26.
 96. Page RC, Eke PI. Case Definitions for Use in Population-Based Surveillance of Periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78(7s):1387–99.
 97. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89(December 2017):S173–S182.
 98. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20):S149–61.
 99. Dietrich T, Ower P, Tank M, West NX, Walter C, Needleman I, et al. Periodontal diagnosis in the context of the 2017 classification system of periodontal diseases and conditions – Implementation in clinical practice. *Br Dent J*. 2019;226(1):16–22.
 100. Sanz M, Teughels W. Innovations in non-surgical periodontal therapy: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2008;35(SUPPL. 8):3–7.
 101. Waykole YP, Doiphode SS, Rakhewar PS, Mhaske M. Anticytokine therapy for periodontal diseases: Where are we now? *J Indian Soc Periodontol*. 2009;13(2):64–8.
 102. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005;23(5):479–90.
 103. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-Like Cytokine IL-33 Is Constitutively Expressed in the Nucleus of Endothelial Cells and Epithelial Cells In Vivo: A Novel “Alarmin”? *PLoS One*. 2008;3(10):1–8.
 104. Saidi S, Bouri F, Lencel P, Duplomb L, Baud’huin M, Delplace S, et al. IL-33 is expressed in human osteoblasts, but has no direct effect on bone remodeling. *Cytokine*. 2011;53(3):347–54.
 105. Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. *Immunity*. 2015;42(6):1005–19.
 106. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre D-A, Americh L, Aguilar L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in

- vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(1):282–7.
107. Liew FY, Girard J, Turnquist HR. Interleukin - 33 in health and disease. *Nat Publ Gr.* 2016;16(11):676–89.
 108. Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev.* 2018;281(1):154–68.
 109. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, et al. Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases. *Immunity.* 2009;31(1):84–98.
 110. Cohen ES, Scott IC, Majithiya JB, Rapley L, Kemp BP, England E, et al. Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nat Commun.* 2015;6(1):1–10.
 111. Iwahana H, Yanagisawa K, Ito-kosaka A, Kuroiwa K, Tago K, Komatsu N, et al. Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. *Eur J Biochem.* 1999;264(2):397–406.
 112. Tominaga SI, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Komatsu N. Presence and Expression of a Novel Variant Form of ST2 Gene Product in Human Leukemic Cell Line UT-7/GM. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;264(1):14–8.
 113. Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S-I. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem.* 2007;282(36):26369–80.
 114. Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein RA. IL-1 Receptor Accessory Protein and ST2 Comprise the IL-33 Receptor Complex. *J Immunol.* 2007;179(4):2551–5.
 115. Palmer G, Lipsky BP, Smithgall MD, Meininger D, Siu S, Talabot-Ayer D, et al. The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. *Cytokine.* 2008;42(3):358–64.
 116. Lin J, Zhang L, Zhao G, Su Z, Deng R, Pflugfelder SC, et al. A Novel Interleukin 33/ST2 Signaling Regulates Inflammatory Response in Human Corneal Epithelium. *PLoS One.* 2013;8(4):1–7.
 117. Zhao Q, Chen G. Role of IL-33 and its receptor in T cell-mediated autoimmune diseases. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–10.
 118. Bulek K, Swaidani S, Qin J, Lu Y, Gulen MF, Herjan T, et al. The essential role of SIGIRR/TIR8 in regulation of Th2 immune response. *J Immunol.* 2009;182(5):2601–9.

119. Matta BM, Reichenbach DK, Zhang X, Mathews L, Koehn BH, Dwyer GK, et al. Peri-alloHCT IL-33 administration expands recipient T-regulatory cells that protect mice against acute GVHD. *Blood*. 2016;128(3):427–39.
120. Matta BM, Lott JM, Mathews LR, Liu Q, Rosborough BR, Blazar BR, et al. IL-33 Is an Unconventional Alarmin That Stimulates IL-2 Secretion by Dendritic Cells To Selectively Expand IL-33R/ST2 + Regulatory T Cells . *J Immunol*. 2014;193(8):4010–20.
121. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, et al. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation By Promoting Regulatory T Cell Numbers. *Immunity*. 2015;43(1):175–86.
122. Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, Alenghat T, Ziegler CGK, Doering TA, et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol*. 2011;12(11):1045–54.
123. Monticelli LA, Osborne LC, Noti M, Tran S V., Zaiss DMW, Artis D. IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(34):10762–7.
124. Limón-Licona P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. Th2 , allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Publ*. 2013;14(6):536–42.
125. Mirchandani AS, Salmond RJ, Liew FY. Interleukin-33 and the function of innate lymphoid cells. *Trends Immunol*. 2012;33(8):389–96.
126. Koyasu S, Moro K. Innate Th2-type immune responses and the natural helper cell , a newly identified lymphocyte population. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011;11(2):109–14.
127. Kurowska-stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, et al. IL-33 Induces Antigen-Specific IL-5+ T Cells and Promotes Allergic-Induced Airway Inflammation Independent of IL-4. *J Immunol*. 2008;181(7):4780–4790.
128. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol*. 2009;39:1046–55.
129. Yang Q, Li G, Zhu Y, Liu L, Chen E, Turnquist H, et al. IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8 + T cells. *Eur J Immunol*. 2011;41(11):3351–60.
130. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of Osteoimmunology and the Host Response

- in Endodontic and Periodontal Lesions. *J Oral Microbiol.* 2011;3(5304):1–15.
131. Lunderius-Andersson C, Enoksson M, Nilsson G. Mast cells respond to cell injury through the recognition of IL-33. *Front Immunol.* 2012;3(82):1–9.
 132. Verri WA, Souto FO, Vieira SM, Almeida SCL, Fukada SY, Xu D, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(9):1697–703.
 133. Ali S, Huber M, Kollewe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(47):18660–5.
 134. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BP, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen- reactive Th2 cells, iNKT and NK Cells. *Int Immunol.* 2008;20(8):1019–30.
 135. Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. IL-33 – activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(5):1047–54.
 136. Komai-Koma M, Xu D, Li Y, McKenzie ANJ, McInnes IB, Liew FY. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(10):2779–86.
 137. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis ? *J Clin Periodontol.* 2011;38(Suppl. 38):60–84.
 138. Gemmell E, Seymour GJ. Cytokine Profiles of Cells Extracted from Humans with Periodontal Diseases. *J Dent Res.* 1998;77(1):16–26.
 139. 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.
 140. Tada H, Matsuyama T, Nishioka T, Hagiwara M, Kiyoura Y, Shimauchi H, et al. *Porphyromonas gingivalis* Gingipain- Dependently Enhances IL-33 Production in Human Gingival Epithelial Cells. *PLoS One.* 2016;11(4):1–21.
 141. Saenz SA, Taylor BC, Artis D. Welcome to the neighborhood : epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev.* 2008;226(1):172–90.
 142. Paul WE, Zhu J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol.* 2010;10(4):225–35.

143. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res*. 2015;2015:1–10.
144. Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA, et al. Interleukin 1 Induces Multinucleation and Bone-Resorbing Activity of Osteoclasts in the Absence of Osteoblasts/Stromal Cells. *Exp Cell Res*. 1999;247(1):84–93.
145. Kitaura H, Sands MS, Aya K, Zhou P, Hirayama T, Uthgenannt B, et al. Marrow Stromal Cells and Osteoclast Precursors Differentially Contribute to TNF- α -Induced Osteoclastogenesis In Vivo. *J Immunol*. 2004;173(8):4838–46.
146. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(1):49–60.
147. Lap  rine O, Cloitre A, Caillon J, Huck O, Bugueno IM, Pilet P, et al. Interleukin-33 and RANK-L interplay in the alveolar bone loss associated to periodontitis. *PLoS One*. 2016;11(12):1–17.
148. Papachristou DJ, Basdra EK, Papavassiliou AG. Bone Metastases : Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Interventions. *Med Res Rev*. 2010;32(3):611–36.
149. Dougall WC. Molecular Pathways : Osteoclast-Dependent and Osteoclast-Independent Roles of the RANKL / RANK / OPG Pathway in Tumorigenesis and Metastasis Pathway in Tumorigenesis and Metastasis. *Clin Cancer Res*. 2012;18(2):326–65.
150. Mun SH, Ko NY, Kim HS, Kim JW, Kim DK, Kim A-R, et al. Interleukin-33 stimulates formation of functional osteoclasts from human CD14 + monocytes. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(22):3883–92.
151. K  seo  lu S, Hatipo  lu M, Sa  lam M, , Enho   S, Esen HH. Interleukin-33 could play an important role in the pathogenesis of periodontitis. *J Periodontal Res*. 2014;50(4):525–534.
152. Schulze J, Bickert T, Beil FT, Zaiss MM, Albers J, Wintges K, et al. Interleukin-33 Is Expressed in Differentiated Osteoblasts and Blocks Osteoclast Formation From Bone Marrow Precursor Cells. *J Bone Miner Res*. 2011;26(4):704–17.
153. Saleh H, Eeles D, Hodge JM, Nicholson GC, Gu R, Pompolo S, et al. Interleukin-33, a target of Parathyroid Hormone and Oncostatin M, Increases Osteoblastic Matrix Mineral Deposition and Inhibits Osteoclast Formation in Vitro. *Endocrinology*. 2011;152(5):1911–22.
154. Xiangyang Z, Lutian Y, Lin Z, Liping X, Hui S, Jing L. Increased levels of interleukin-

- 33 associated with bone erosion in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2012;58(1):6–9.
155. Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(31):10913–8.
 156. Leung BP, Xu D, Culshaw S, McInnes IB, Liew FY. A Novel Therapy of Murine Collagen-Induced Arthritis with Soluble T1/ST2. *J Immunol*. 2004;173(1):145–50.
 157. Martin P, Talabot-ayer D, Seemayer CA, Vigne S, Lamacchia C, Rodriguez E, et al. Disease severity in K / BxN serum transfer-induced arthritis is not affected by IL-33 deficiency. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(1):1–14.
 158. Palmer G, Talabot-ayer D, Toy D, Seemayer CA, Finckh A, Smith DE, et al. Inhibition of Interleukin-33 Signaling Attenuates the Severity of Experimental Arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(3):738–49.
 159. Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard J-P. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A–H2B acidic pocket. *Sci Rep*. 2008;9(10):1006–12.
 160. Baekkevold ES, Roussigne M, Yamanaka T, Johansen F-E, Jahnsen FL, Amalric F, et al. Molecular Characterization of NF-HEV , a Nuclear Factor Preferentially Expressed in Human High Endothelial Venules. *Am J Pathol*. 2003;163(1):69–79.
 161. Bae S, Kang T, Hong J, Lee S, Choi J, Jhun H, et al. Contradictory Functions (Activation/Termination) of Neutrophil Proteinase 3 Enzyme (PR3) in Interleukin-33 Biological Activity. *J Biol Chem*. 2012;287(11):8205–13.
 162. Lefrançois E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Jean-Philippe G, et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(5):1673–8.
 163. Liu X, Hammel M, He Y, Tainer JA, Jeng U-S, Zhang L, et al. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *PNAS*. 2013;110(37):14918–23.
 164. Gordon ED, Palandra J, Wesolowska-andersen A, Ringel L, Rios CL, Lachowicz-scroggins ME, et al. IL1RL1 asthma risk variants regulate airway type 2 inflammation. *JCI insight*. 2016;1(14):1–13.
 165. Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J*.

- 1994;13(5):1176–88.
166. Dijk FN, Xu C, Melén E, Carsin A, Kumar A, Nolte IM, et al. Genetic regulation of IL1RL1 methylation and IL1RL1-a protein levels in asthma. *Eur Respir J*. 2018;51(3):1–12.
 167. Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, Tetsuka T, Tominaga S. Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS Lett*. 1993;318(1):83–7.
 168. Iwahana H, Hayakawa M, Kuroiwa K, Tago K, Yanagisawa K, Noji S, et al. Molecular cloning of the chicken ST2 gene and a novel variant form of the ST2 gene product, ST2LV. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr*. 2004;1681(1):1–14.
 169. Ponomarenko J V., Orlova G V., Merkulova TI, Gorshkova E V., Fokin ON, Vasiliev G V., et al. rSNP _ Guide : An Integrated Database-Tools System for Studying SNPs and Site-Directed Mutations in Transcription Factor Binding Sites. *Hum Mutat*. 2002;248(4):239–48.
 170. Tsuneto PY, de Souza VH, de Alencar JB, Zacarias JMV, Silva CO, Visentainer JE, et al. IL18 Polymorphism and Periodontitis Susceptibility, Regardless of IL12B, MMP9, and Smoking Habits. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:1–9.
 171. Wu H, Romieu I, Shi M, Hancock DB, Li H, Monge-Sienra JJ, et al. Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):321–7.
 172. Latiano A, Palmieri O, Pastorelli L, Vecchi M, Pizarro TT, Bossa F, et al. Associations between Genetic Polymorphisms in IL-33 , IL1R1 and Risk for Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One*. 2013;8(4):1–9.
 173. Chapuis J, Hot D, Hansmannel F, Kerdraon O, Ferreira S, Hubans C, et al. Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer ' s disease. *Mol Psychiatry*. 2009;14(11):1004–16.
 174. Yu JT, Song JH, Wang ND, Wu ZC, Zhang Q, Zhang N, et al. Implication of IL-33 gene polymorphism in Chinese patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012;33(5):1014.e11-1014.e14.
 175. Sakashita M, Yoshimoto T, Hirota T, Harada M, Okubo K, Osawa Y, et al. Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(12):1875–81.
 176. Xu W, Liu Y, Ye D. Association between IL-33 Gene Polymorphisms (rs1929992,

- rs7044343) and Systemic Lupus Erythematosus in a Chinese Han Population. *Immunol Invest.* 2016;45(7):575–83.
177. Jafarzadeh A, Minaee K, Farsinejad A-R, Nemati M, Khosravimashizi A, Daneshvar H, et al. Evaluation of the circulating levels of IL-12 and IL-33 in patients with breast cancer: Influences of the tumor stages and cytokine gene polymorphisms. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(12):1189–98.
 178. Bassagh A, Jafarzadeh A, Kazemipour N, Nemati M, Aminizadeh N, Larussa T, et al. Decreased circulating interleukin-33 concentration in *Helicobacter pylori*-infected patients with peptic ulcer: Evaluation of its association with a cytokine gene polymorphism, gender of patients and bacterial virulence factor CagA. *Microb Pathog.* 2019;136:1–8.
 179. Tu X, Nie S, Liao Y, Zhang H, Fan Q, Xu C, et al. The IL-33-ST2L Pathway Is Associated with Coronary Artery Disease in a Chinese Han Population. *Am J Hum Genet.* 2013;93(4):652–60.
 180. Castano R, Bossé Y, Endam LM, Desrosiers M. Evidence of association of interleukin-1 receptor-like 1 gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy.* 2009;23(4):377–84.
 181. Akhabir L, Sandford A. Genetics of Interleukin 1 Receptor-Like 1 in Immune and Inflammatory Diseases. *Curr Genomics.* 2010;11(8):591–606.
 182. Wei ZH, Li YY, Huang SQ, Tan ZQ. Genetic variants in IL-33/ST2 pathway with the susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Cytokine.* 2019;118:124–9.
 183. Wu F, Li L, Wen Q, Yang J, Chen Z, Wu P, et al. A functional variant in ST2 gene is associated with risk of hypertension via interfering MiR-202-3p. *J Cell Mol Med.* 2017;21(7):1–8.
 184. Papapanou PN. Periodontal Diseases: Epidemiology. *Ann Periodontol.* 2010;1(1):1–36.
 185. Wang JL, Liu J, Xie KG, Lan CG, Lu L, Tang YJ. Association between functional polymorphisms in IL-33/ST2 pathway and risk of osteosarcoma. *J Cell Mol Med.* 2018;22(8):3808–15.
 186. López-Mejías R, Genre F, Remuzgo-Martínez S, Robustillo-Villarino M, García-Bermúdez M, Llorca J, et al. Protective Role of the Interleukin 33 rs3939286 Gene Polymorphism in the Development of Subclinical Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis Patients. *PLoS One.* 2015;10(11):1–8.

187. Ginaldi L, De Martinis M, Saitta S, Sirufo MM, Mannucci C, Casciaro M, et al. Interleukin-33 serum levels in postmenopausal women with osteoporosis. *Sci Rep.* 2019;9(3786):1–7.

CAPÍTULO II

THE INFLUENCE OF GENETIC POLYMORPHISMS OF *IL33* AND *IL1RL1* GENES ON THE IMMUNOPATHOGENESIS OF PERIODONTITIS

AléiaHarumiUchibaba Yamanaka¹, Josiane Bazzo de Alencar², Victor Hugo Souza³, Cléverson O. Silva⁴, Ana Maria Sell⁵, Quirino Alves de Lima Neto⁶

¹ Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka – Post-Graduation Program in Biosciences and Physiopathology, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, Maringá State University, Paraná, Brazil. aleiayamanaka@hotmail.com

² Josiane Bazzo de Alencar - PhD Department of Basic Health Sciences, Maringá State University, Paraná, Brazil. josibazzo@gmail.com

³ Victor Hugo Souza - Post Graduation Program in Biosciences and Physiopathology, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, Maringá State University, Paraná, Brazil. victoruem@gmail.com

⁴ Cléverson O. Silva - PhD - Department of Dentistry, Maringá State University, Paraná, Brazil. prof.cleversonsilva@gmail.com

⁵ Ana Maria Sell – PhD - Department of Basic Health Sciences, Maringá State University, Paraná, Brazil. Post-Graduation Program in Biosciences and Physiopathology, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, Maringá State University, Paraná, Brazil. anamsell@gmail.com

⁶ *Corresponding author: Quirino Alves de Lima Neto - PhD - Department of Basic Health Sciences, Maringá State University, Paraná, Brazil. Post-Graduation Program in Biosciences and Physiopathology, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, Maringá State University, Paraná, Brazil.

Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790 87020-900 – Maringá, Paraná, Brazil

Tel.: +554430114861

E-mail: glneto@uem.br

Abstract

Background: Periodontitis (PD) is an inflammatory disease that affects the protective and supporting tissues of teeth, such as gingiva, periodontal ligament and alveolar bone. Cytokines and their genetic polymorphisms could interfere in the immunopathogenesis of PD, but the role played by IL-33 and its receptor is not clear.

Objective: The objective of the study was to analyze the polymorphisms in *IL33* (*rs1929992* and *rs7925417*) and *IL1RL1* (*rs11685424* and *rs3821204*) genes in the development of periodontitis, as well as the serum levels of the IL-33 cytokine.

Material and Methods: A case-control study was performed in 186 patients with PD and 189 healthy controls. DNA extraction was performed by *salting-out* and a Qiagen extraction kit according to the manufacturer. The genotypes were determined by the PCR-SSP technique. Serum levels of IL-33 were determined by the immunoenzymatic method (ELISA). The software SNPStats, and OpenEpi were used to compare the frequency between cases and controls. The risk (OR) was considered only for values of $P < 0.05$. The Shapiro-Wilk and Student's *t* tests were used to assess the correlation between IL-33 levels between groups.

Results: The *IL33 rs7025417 C/C* genotype was associated with risk for the development of PD in recessive model (OR = 12.86, CI = 1.60 - 103.49, $P_c = 0.002$). While the *IL1RL1 rs3821204 G/G* genotype was less frequent in patients than in controls in the recessive model (OR = 0.19, CI = 0.05 - 0.72, $P_c = 0.012$). Serum IL-33 levels were increased in patients vs controls (mean $\pm$ SD: 250.4 ± 54.4 pg/mL vs. 0.0 ± 0.0 pg/mL; $P < 0.0001$), but with no changes within groups of patients. No statistical differences were observed between patients and controls in the allelic and genotypic distribution of *IL33 rs1929992* and *IL1RL1 rs11685424* SNPs.

Conclusion: The polymorphisms of *IL33 rs7025417* and *IL1RL1 rs3821204* were associated with the development of PD, conferring risk and protection, respectively, and the production of IL-33 is higher in patients with PD than controls, independent of extent or severity of the disease.

Keywords: Alarmins, Interleukin-1 Receptor-Like 1 Protein, Case-control studies, Genetic Association Studies.

1. Introduction

Periodontitis (PD) begins with the disturbance of homeostasis by anaerobic gram-negative bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis*.¹ Close to soft tissues of the periodontium, these bacteria are able to activate the immune system and initiate an inflammatory process that extends to the supporting periodontal tissues, causing the destruction of the gingiva, periodontal ligament and alveolar bone.²⁻⁴ Failures to resolve this inflammatory process lead to persistence of pathogens and worsening of the lesions.² In PD, the destruction of extracellular matrix components and bone remodeling are directed by inflammatory mediators such as Interleukins (IL) -1 α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-8, Tumor Necrosis Factor (TNF- α), Matrix Metalloproteinases (MMPs) and RANK Ligand (RANKL). These mediators stimulate osteoclastogenesis, destruction of the extracellular matrix, and the chemotaxis mainly of neutrophils, which increases the production of pro-inflammatory cytokines, allowing the maintenance of inflammatory state in the tissue.⁵⁻⁹ Thus, both cytokines and their receptors play an important role during the pathogenesis of PD.

Interleukin-33 (IL-33) belongs to the IL-1 cytokine family, and is encoded by the gene with the same name, which is localized on 9p24.1. IL-33 is produced constitutively and abundantly in endothelial, epithelial and fibroblast cells¹⁰, where it acts as an endogenous nuclear factor.¹¹ The receptor (ST2) is encoded by the gene *IL1RL1* (localization 2q12.1), and can be expressed from 3 different ways: transmembranar (ST2L), soluble (sST2) and variant (ST2V), generated by alternative splicing.^{12,13} IL-33 needs to be bound to its receptor to perform its functions.¹⁰ ST2 is constitutively expressed in mast cells, basophils, neutrophils, M2 macrophages, dendritic cells, natural killer cell (NK), B and T lymphocytes (Th1, Th2, Treg), type 2 innate lymphoid cells (ILC2). In case of tissue damage, necrosis or cellular stress, IL-33 is released to extracellular space, where it is cleaved by mast cell and neutrophil proteases and plays as an inflammatory cytokine.¹⁴

Once the cytokine binds to ST2, the IL-33/ST2 complex recruits interleukin 1 receptor accessory protein (IL1-RAcP), and, together, they activate the intracellular signaling pathway¹⁵ with recruitment of MyD88, IRAK-1, IRAK-4 and TRAF-6. These events culminate in the activation of NF- κ B and MAPKs that direct the production of pro-inflammatory cytokines. The IL-33/ST2 axis is known to increase the serum levels

of IgE and IgA, and amplify Th2 type responses, with expression of IL-4, IL-5, IL-6, and IL-13.¹⁰ These cytokines induce the production of antibodies by B lymphocytes and plasmacytes, cells frequently found in periodontal lesions.^{16,17} This suggests that there may be a correlation between the Th2 response mediated by the IL-33/ST2 axis and the immunopathogenesis of PD. In addition, IL-33 was related to the bone resorption process, in which the presence of this cytokine leads to osteoclast differentiation and resorption of bone matrix components.^{18,19} The soluble sST2 receptor acts as an antagonist, sequestering IL-33, and preventing its action on the intracellular signaling pathway. Martin *et al.*²⁰ demonstrated that suppression of ST2 in *knock-out* murine attenuated the symptoms of arthritis, as well as, the binding of IL-33 to sST2 antagonist receptor.²¹ In both cases, the IL-33 effect on bone resorption has been softened, showing that this may be a therapeutic possibility for bone involvement diseases.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most frequent mutations within the genome, and it is consequence of the exchange of one nucleotide. SNPs in coding regions could alter the conformation and function of the expressed protein. While SNPs in non-coding regions of the gene could alter the production of the protein²², such as the *IL33* and their *IL1RL1* receptor SNPs could alter the progression of PD. Thus, the objective of this study was to analyze the influence of polymorphisms in the *IL33* (*rs1929992* and *rs7925417*) and *IL1RL1* (*rs11685424* and *rs3821204*) genes in smokers and nonsmokers, as well as the serum levels of the IL-33 cytokine, in the pathogenesis of periodontitis in individuals from the north/northeast region of Paraná, Brazil.

2. Material and methods

2.1. Sample selection

This case-control study included 375 individuals from the north and northeast of Paraná, south of Brazil. All subjects were selected by an experienced Periodontist at the State University of Maringá (UEM) and Ingá University Center (UNINGÁ), from 2012 to 2020, and signed a free and informed consent form. This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the State University of Maringá (UEM - COPEP Nº. 719/2011, 12/02/2011 and CAAE/2016 Nº 61544916.4.000.0104).

Participants were assessed for probing depth, bleeding on probing, and clinical attachment loss for four sites of each tooth (mesial, buccal, distal and lingual),

and classified according to the International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions of 1999.²³ PD patients should have at least five sites on different teeth with probing depth ≥ 5 mm, clinical attachment loss ≥ 3 mm and more than 25% of bleeding on probing. According to the new classification of 2017²⁴, individuals with PD can be included in stages II and III based on severity, complexity, extension and distribution, and grade B (moderate rate of progression). The control group was composed of healthy individuals for PD, with probing depth < 4 mm and less than 25% bleeding on probing.

All individuals selected in this study were over 30 years old and had at least 20 teeth in the oral cavity. Individuals who had diabetes mellitus, acute infections, bone involvement diseases, use of antibiotics or anti-inflammatories, gingivitis, aggressive PD (stage IV and grade C of periodontitis) and who underwent periodontal treatment in the last 6 months were not included in this study. From individual interviews, the ethnic group and smoking history of those selected subjects were determined. Individuals who did not know how to estimate the date who abstained from smoking, or who stopped less than 10 years ago were included in the group of smokers, according to what was proposed by Bergstrom *et al.*²⁵

2.2. Sample collection and DNA extraction:

The peripheral blood samples were collected by venous blood puncture in a tube containing EDTA. Buffy coat or whole blood was stored inside cryopreservation tubes at -20°C . DNA extraction was performed using the modified *salting-out* methodology²⁶ or the QIAamp® DNA blood mini kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturers' recommendations. DNA concentrations and quality were assessed by optical density using the Thermo Scientific Nanodrop 2000® equipment (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

2.3. Genotype analysis and visualization of the amplified product:

The genotyping performed by the polymerase chain reaction using sequence-specific primers (PCR-SSP). As internal reaction control, primers for the human growth hormone (hGH) gene were added, which amplifies a 434 bp fragment. The amplifications were performed in a thermocycler (System 9700 Applied Biosystems®,

Foster City, CA, USA). The final concentrations and cycling conditions for all SNPs are shown in table 1.

The PCR products were viewed by electrophoresis on agarose gel with SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). The PCR results were analyzed by comparison with a 100 bp molecular size marker (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY).

Table 1. Final concentrations of PCR components and cycling conditions for the detection of *IL33* (*rs1929992* and *rs7025417*) and *IL1RL1* (*rs3821204* and *rs11685424*) polymorphism.

PCR reagents		Final concentration			
		rs1929992 T>C	rs7025417 T>C	rs3821204 C>G	rs11685424 G>A
Ultrapure Water		Q.S.to10 µL	Q.S.to10 µL	Q.S.to10 µL	Q.S.to10 µL
PCR buffer		1X	1X	1X	1X
MgCl ₂		1.0 mM (T) or 1.5 mM (C)	1.5 mM	1.5 mM	1.0 mM
dNTP mixture		0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM
Primer forward/reverse		0.25 mM	0.5 mM	0.25 mM	0.25 mM
HGH forward/reverse		0.1 mM	0.08 mM	0.1 mM	0.1 mM
Taq DNA Polymerase		0.5 U	0.5 U	0.5 U	0.5 U
Template DNA		50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
Cycling condition/ Steps		Temperature/time			
	n° of cycles				
Initial denaturation	1	95 °C / 15 min	95 °C / 15 min	95 °C / 15 min	95 °C / 15 min
Denature	30	95 °C / 30 s	95 °C / 30 s	95 °C / 30 s	95 °C / 30 s
Anneal	1	62 °C / 30s	64 °C / 30 s	62 °C / 30s	62 °C / 30s
Extend	1	72 °C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 30 s
Final extension	1	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min
Hold	1	4 °C / ∞	4 °C / ∞	4 °C / ∞	4 °C / ∞

Q. S. to10 µL = quantum satis to 10 µL; min = minutes; s = seconds.

2.4. Standardization of PCR-SSP technique

The standardization of PCR-SSP technique was performed by sequencing reactions with specific primers. For each SNP, at least one representative of each genotype was chosen, being homozygote wild and mutant and heterozygous. The

PCR reaction was performed in 20 μ L final volume with 0.25 mM of each primer, 1.5 mM of $MgCl_2$, 0.2 mM of dNTP (Invitrogen®, Frederick, MD, USA), 1X PCR buffer (10X buffer 50 mM Invitrogen®, USA), 0.5 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY) and 50 ng of DNA. Cycles were performed in thermal cycler (Applied Biosystems): 15 minutes at 95°C; 30 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 62°C, and 30 seconds at 72°C; at the end, 10 minutes at 72°C. The sequencing reactions were performed with the BigDye™ terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer in an automated DNA sequencer (Applied Biosystems 3500xL).

The sequences obtained were compared with sequences available in the GenBank. For these analyzes, the EMBOSS Needle online tool (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) and the FinchTV program version 1.4.0 were used.

2.5. Determination of the IL-33 serum levels

The determination of the concentration of IL-33 was performed by immunoenzymatic method (ELISA), using the Human IL-33 ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to the manufacturer's recommendations. The absorbance of each well was read at 450 nm by the ELISA reader (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria). The assay range was 7.8 - 500 pg/mL.

2.6. Statistical analysis

The QUANTO software version 1.2.4. was used to calculate the minimum number of samples for adequate statistical power ($\geq 80\%$).²⁷ The lowest frequency allele was considered at the significance level of 0.05, two-tailed test, KP = 0.50, dominant model, to detect a risk effect of 2.0. Age and gender covariates were matched using the OpenEpi version 3.01 program (https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm) using the Student t-test or chi-square test with the Yates correction. The SNPStats software (<https://www.snpstats.net/start.htm>) was used for descriptive analysis, to determine the Hardy-Weinberg equilibrium between expected and observed genotype frequencies, and for the association tests between SNPs with logistic regression.

multivariate, using the chi-square test with Yates correction. In analyzes which all individuals were included, smoking adjustments were performed, in order to eliminate this confounding factor. All analyzes were adjusted for gender and age by multivariate logistic regression. To avoid the effect of biases such as smoking, smokers and nonsmokers were also analyzed separately. The association tests were performed for the codominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive inheritance models, and the best inheritance model was chosen according to the lowest Akaike Information Criterion (AIC).²⁸ Bonferroni correction (BC) method was applied for statistically significant results by multiplying the *P*-values by the number of SNPs evaluated. *Odds Ratio* (OR) was analyzed only for *P*-value statistically significant, with 95% confidence intervals (CI = 95%). Regarding the cytokine dosage, statistical analyzes were performed using the BioEstat 5.0 program. The Shapiro-Wilk test was used to assess the normality of the samples, and the Student's *t* test was chosen to assess correlation between groups. For all tests, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

The characteristics of the population are shown in Table 2. For this study, 375 individuals were analyzed, which 186 was included in patients' group and 189 in controls without PD. Women were 56.45% of patients and 60.85% of control group. The mean age was 46.73 ± 9.09 and 45.17 ± 9.09 years old for patients and controls, respectively. The patients and controls were matched by gender and age ($P > 0.05$), suggesting adequate matching between cases and controls. The population was divided between nonsmoker and smoker, and even after, the matched was maintained for age and gender. The smoking habit differed between patients and controls, with a higher frequency of smokers among individuals with PD (OR = 2.38, CI = 1.52 - 3.71, $P = 0.0001$). About statistic power, for *IL33 rs1929992*, *IL33 rs7025417*, *IL1RL1 rs11685424* and *IL1RL1 rs3821204* SNPs the power values were 90.3%, 90%, 84.9% and 89.1%, respectively, in the group in which all were included. For the other groups, it was lower than 80%. All groups analyzed for all SNPs had genotypic frequencies according to what was expected for the Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$).

Table 2: Characteristics of controls and patients with periodontitis (PD).

	Controls N=189 n (%)	Periodontitis N=186 n (%)	P-value	OR (CI = 95%)
Age (years)				
Mean $\pm$ SD	45.17 $\pm$ 9.09	46.73 $\pm$ 9.09	$P > 0.05$	
Gender				
Female	115 (60.85)	105 (56.45)	$P > 0.05$	
Male	74 (39.15)	81 (43.55)		
Smoking				
Non-smokers	145 (76.72)	108 (58.06)	0.0001	2.38 (1.52 – 3.71)
Smokers	44 (23.28)	78 (41.94)		

N= total number, n = number of individuals, OR=Odds Ratio, CI = confidence interval, SD = standard deviation.

Regarding the allele frequency, there were no statistically significant differences for the four SNPs evaluated between patients with PD and controls (Table 3). The differences in the distribution of genotypes between patients and controls was observed for *IL33 rs7025417* and *IL1RL1 rs3821204* SNPs, in the group of nonsmokers and all individuals, respectively. Within the group of smokers, there were no differences in the frequencies of genotypes and alleles between cases and controls for these SNPs.

Tabela 3: Allele frequency distribution in the *IL33 rs1929992*, *IL33 rs7025417*, *IL1RL1 rs3821204* and *IL1RL1 rs11685424* polymorphisms in patients with periodontitis and controls in the population with all individuals included.

Genes - Polymorphism	Allele	All individuals N=375		P-value
		Periodontitis n (%)	Controls n (%)	
<i>IL33 - rs1929992</i>	T	246 (32,8)	236 (31,5)	0,32
	C	126 (16,8)	142 (18,9)	
<i>IL33 - rs7025417</i>	T	289 (38,5)	315 (42)	0,06
	C	83 (11,1)	63 (8,4)	
<i>IL1RL1 - rs3821204</i>	C	307 (40,9)	300 (30)	0,31
	G	65 (8,7)	78 (10,4)	
<i>IL1RL1 - rs11685424</i>	G	197 (26,3)	194 (25,9)	0,7
	A	175 (23,3)	184 (24,5)	

N = total number, n = number of individuals.

The *IL33 rs1929992* and *IL33 rs7025417* SNPs were in high linkage disequilibrium ($D' = 0.85$, $P < 0.00001$), in the same way *IL1RL1 rs11685424* and *IL1RL1 rs3821204* SNPs ($D' = 0.7433$, $P < 0.0001$) which suggests that the alleles are

inherited together. Thus, it was considered that the alleles of the SNPs of IL33 and IL1RL1 as a single group, therefore, the P values were multiplied by 2 in the correction of Bonferroni.

In non-smokers, *IL33 rs7025417* was associated with risk for the development of PD in the codominant and recessive inheritance model (table 4) and the recessive model was selected due to the lower AIC value. The data obtained show that individuals who had *IL33 rs7025417 C/C* genotype were more frequency in patients than in controls when compared to individuals with T/T and T/C genotypes (8.3% vs 0.7%, $P_c = 0.001$). The high confidence interval observed is due to the statistical power of 75%. Even after BC, the risk ratio remained ($P_c = 0.002$).

The *IL1RL1 rs3821204* SNP was associated with protection for PD in the codominant and recessive models (table 4), and the recessive model was selected as the best representative of the results because of the lower AIC value. Individuals with *IL1RL1 rs3821204 G/G* genotype were less frequency in patients than in controls when compared to individuals with C/C and C/G genotypes (1.6% vs 5.8%, $P_c = 0.012$). After BC, the protection ratio was maintained only in recessive models ($P_c = 0.012$). When the subgroups of smokers and non-smokers were analyzed separately, *IL1RL1 rs3821204 G/G* genotype tends to be protective: the frequency of *IL1RL1 rs3821204 G/G* is lower in patients when compared to controls in smokers (2.6% vs 11.4%, $P = 0.05$); non-smokers (0.9% vs 4.1%, $P = 0.06$). However, this association could not be statically confirmed, probably due to the low statistical power of this analysis in the group of nonsmokers and smokers, 74.6% and 44.6%, respectively.

Table 4: Genotype frequencies distribution for *IL33 rs7025417* and *IL1RL1 rs3821204* polymorphisms in patients with periodontitis and controls in nonsmokers and all individuals.

		Non-smokers N= 253					
Gene/Polymorphism/ Inheritance Model	Genotypes	Periodontitis N=108 n (%)	Controls N= 145 n (%)	<i>P</i> - <i>value</i>	<i>P</i> _c	OR (CI)	AIC
<i>IL33 - rs7025417</i> <i>T>C</i>							
Codominat	T/T	68 (63)	99 (68.3)	0.006	0.012	Ref.	343.6
	T/C	31 (28.7)	45 (31)			1 (0.57 – 1.73)	
	C/C	9 (8.3)	1 (0.7)			12.85 (1.59 – 104.11)	
Recessive	T/T – T/C	99 (91.7)	144 (99.3)	0.001	0.002	Ref.	341.6
	C/C	9 (8.3)	1 (0.7)			12.86 (1.60 – 103.49)	
All individuals N= 375							
<i>IL1RL1 - rs3821204</i> <i>C>G</i>		N= 186	N=189				
Codominat	C/C	124 (66.7)	122 (64.5)	0.026	0.052	Ref. ^a	505.5
	C/G	59 (31.7)	56 (29.6)			1.01 (0.64 – 1.60) ^a	
	G/G	3 (1.6)	11 (5.8)			0.19 (0.05 – 0.73)^a	
Recessive	C/C – C/G	183 (98.4)	178 (94.2)	0.006	0.012	Ref. ^a	503.5
	G/G	3 (1.6)	11 (5.8)			0.19 (0.05 – 0.72)^a	

N = total number, n = number of individuals, P_c = P-value corrected by Bonferroni, OR=Odds Ratio, CI = confidence interval, AIC= Akaike information criterion, Ref.= Most frequently genotypes (OR = 1)

^a values adjusted for smoking habits

IL33 rs1929992 T>C and *IL1RL1 rs11685424 G>A* were not significantly associated with PD in this study. For all SNPs analyzed, no association was observed when stratification to gender and smoking habits was performed. Differences were also not observed in the frequencies of haplotypes between patients with PD and controls.

IL-33 was measured in 30 non-smoking PD patients and 8 controls. The patients and controls were matched by gender and age ($P > 0.05$). Patients were classified according to the severity of the disease: mild ($n = 6$), moderate ($n = 10$), and severe ($n = 14$); and extension: localized ($n = 15$) and generalized ($n = 15$). The serum levels of IL-33 for the controls were lower than limit detection, as expected in individuals without immune disorders. However, the IL-33 serum levels were increased in patients compared to controls (mean $\pm$ SD: 250.4 ± 54.4 pg/mL vs 0.0 ± 0.0 pg/mL; $P < 0.0001$) (figure 1A). In addition, when comparing the severity and extent of PD, no statistically significant differences were observed (figure 1B). The relationship between serum IL-33 levels and genotypes was not significant for *IL33 rs1929992 T > C* (figure 1C) or for

IL33 rs7025417 T > C (figure 1D), but the *IL33* rs7025417 T/T genotype shows a tendency for increased expression ($P = 0.07$).

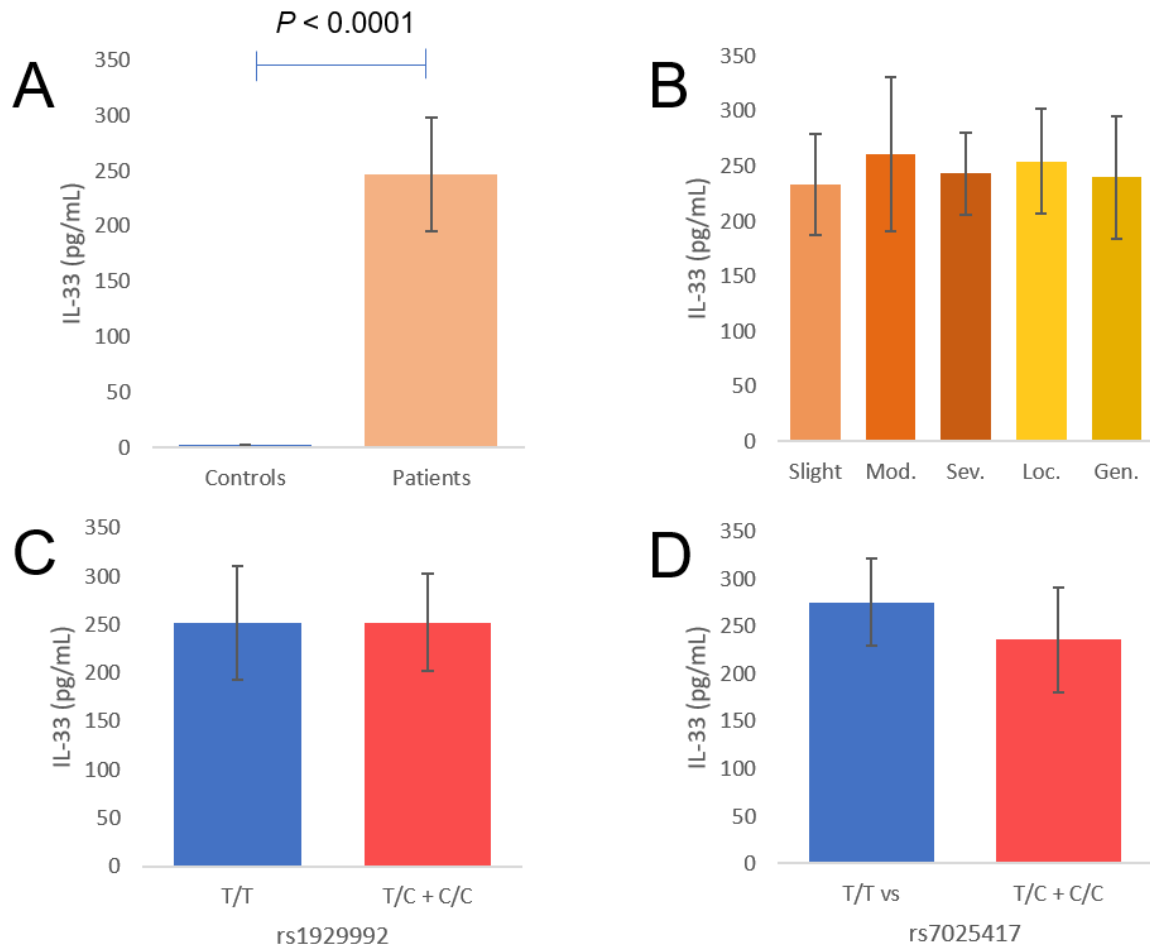


Figure 1. Serum levels of IL-33 in non-smoking patients with periodontitis (PD) and controls. A) Comparison of IL-33 serum levels between patients and controls; B) Comparison of IL-33 concentrations among groups of patients; C) Comparison of IL-33 concentrations between patients with the T/T vs T/C + C/C genotype of rs1929992; D) Comparison of IL-33 concentrations between patients with the T/T vs T/C + C/C genotype of rs7025417. Mod = moderate; Sev = severe; Loc = Localized; Gen = generalized.

4. Discussion

Little is known about the role of the *IL1RL1* in the PD and as far as we know, this is the first study that correlates *IL33* (*rs1929992* and *rs7025417*) and *IL1RL1* (*rs11685424* and *rs3821204*) SNPs with PD. In this study, associations between the SNPs of *IL33* and *IL1LR1* and the developing PD were analyzed. *IL33*

rs7025417 polymorphism was associated with increased risk in the recessive inheritance models, and *IL1RL1 rs3821204* was associated with protection in those same inheritance models, regardless of smoking or gender.

Smoking is a predisposing factor for the development of PD²⁹, nevertheless, in this study we didn't find any association, suggesting that the IL-33/ST2 axis may be involved in the development of the disease independent of the covariate. However, we cannot confirm these findings due to the low statistical power, lower than 50%. Thus, increasing the sample size of this group, could elucidate the influence of IL-33 and ST2 within smokers. Similarly, studies show a positive correlation with the development of PD and gender³⁰, nevertheless, in this study, no association was observed.

PD is characterized by a local inflammatory response that affects soft tissues and support tissues. The disequilibrium of the inflammatory response causes the destruction of the extracellular matrix and the supporting alveolar bone tissue, characteristic of patients with PD.²⁻⁴ The balance between bone formation and resorption guarantees homeostasis, and therefore, an external factor that alters this relationship, can be harmful. Currently, there is no consensus on the role of IL-33 in the bone resorption process.^{31,32} Despite this, the *IL33 rs7025417 C/C* genotypes showed an increased risk of developing PD. Previous studies show that IL-33 drives bone homeostasis, through the capability of increasing RANKL expression³³; or differentiation of osteoclasts independent of RANKL/RANK^{34,35}, favoring osteoclastogenesis. However, other authors concluded that IL-33 inhibits the formation of osteoclasts³³ and increases the production of osteoblasts³⁶, suggesting that IL-33 is not related to bone resorption.³⁷

IL-33 acts as a proinflammatory cytokine in extracellular space, leading to the recruitment of leukocytes, and increases the production of mediators and adhesion molecules.^{38,39} In our study, the *IL33 rs7025417 C/C* genotype was associated with the risk 11-fold of development PD (OR = 12.86, CI = 1.60 - 103.49, $P = 0.001$). The same genotype has been associated with protection in case-control studies in patients with osteosarcoma and controls and decreased production of this cytokine.⁴⁰ On the other hand, in the model of rheumatoid arthritis, another disease that shares immunological mechanisms similar to PD, no effect was observed.⁴¹ It suggests that depending on the

disease, IL-33 action could alter its biological effects, and mediate different immunologic response.

The interaction of IL-33 with sST2 prevents the transmission of the intracellular signaling pathway, decreasing the production of inflammatory mediators.¹⁴ The *IL1RL1 rs3821204* SNP disrupted a putative binding site for miR202-3p, and it causes instability of mRNA sST2 and inhibits expression of sST2 endogenous.⁴² It appears that the reduction in sST2 increases the damaging effects of the IL-33/ST2 pathway. In the arthritis model, the binding of IL-33 to the sST2 antagonist receptor attenuated arthritis symptoms²¹, as well as blocking⁴³ and ST2 suppression.²⁰

Even contradictory, our results showed that the *IL1RL1 rs3821204 G/G* genotype was associated with protection. Previous studies had shown the relationship of the IL-33/ST2 axis in the process of tissue homeostasis⁴⁴, whereas ILC2, Treg and mast cells express high levels of ST2¹⁴. ILC2 activated by IL-33 mediated leads to alternative activation of macrophages, M2 subtype, which act in tissue repair⁴⁴; and increased Treg ST2+.⁴⁵ These events and cells could regulate and limit the inflammatory process.⁴⁴

When the binding of IL-33/ST2 occurs on the surface of mast cells, these cells respond with the production of cytokines, chemokines and lipid mediators. These molecules increase the recruitment of neutrophils, activation and migration of dendritic cells, and polarization of naive T cells to Th2 profile.³⁸ In addition, under IL-33 stimuli, mast cells increase their survival, maturation, adhesion and degranulation.³⁸ Degranulated and total mast cells were more present in patients with severe than moderate PD, as well as inflammatory signs, suggesting that granules may worsen the disease prognosis.⁴⁶

IL-33 is known to amplify the Th2 type response, increasing the production of IL-4, IL-5, IL-6 and IL-13, IgA and IgE, and chemotactic factor Th2 lymphocytes. Because of this, several studies show an association with allergic diseases⁴⁷, asthma⁴⁸, inflammatory bowel diseases⁴⁹, Alzheimer^{50,51}, autoimmune diseases⁵², and cancer.⁵³ In the context of PD, studies indicate an increase in the concentration of IL-33 in the gingival crevicular fluid⁵⁴ and in periodontal tissues³¹. However, no differences were observed in serum, suggesting that IL-33 is not involved in the systemic inflammatory process, but locally.³²

In our study, the concentrations of IL-33 serum levels were lower than the limit of detection in controls, such as has been found for Saidiet *al.*³⁷ Nevertheless, there were differences in the concentration of IL-33 between patients with PD and controls ($P < 0.0001$). It could be explained by a characteristic of the cytokine. IL-33 is produced and accumulated in the nucleus of producing cells. During apoptosis, the cytokine loses its biological function when it is cleaved by caspases 3 or 7.¹⁴ Only during tissue necrosis, injury, damage or cellular stress the cytokine is released into the extracellular space¹⁴, being detectable in the serum, as shown in our results. Sundneset *al.*⁵⁵ had mapped IL-33 in murine skin and found that IL-33 is abundantly expressed in the keratinocyte nucleus in healthy tissue, but it is not found in the extracellular space. Despite this, the same study showed that human IL-33 is not constitutively produced in epithelial cells, but it responds to inflammatory signals, increasing its expression. Therefore, it appears that the higher concentration of IL-33 in patients when compared to controls is due to the inflammatory process, characteristic of PD. These findings corroborate the levels of IL-33 found in our samples of this study.

The relation of IL-33 production and *IL33 rs1929992* and *IL33 rs7025417* SNPs were not significant. Despite this, our data show a trend towards an increase of cytokine production for the *IL33 rs7025417 T/T* genotype (figure 1D). Tu et al.,⁵⁶ demonstrate that cells transfected with plasmids containing *IL33 rs7025417 T* allele had 2-fold increased luciferase activity than those containing *IL33 rs7025417 C* allele.

For distribution of allele, genotype or haplotypes, no significant differences were observed to the *IL-33 rs1929992* and *IL1RL1 rs11685424* SNPs, and there are no studies involving these polymorphisms and development of PD.

This study has its limitations. The low power statistic for the subgroups, after stratification in smokers and non-smokers, can limit the identification of possible associations in these specific groups. In addition, it was not possible to measure sST2 levels, which could provide more conclusive results regarding the relation of the IL-33/ST2 axis and the pathogenesis of PD. Among the positive points of the work, we highlight an efficient method of clinical selection of participants and meticulous selection and non-inclusion criteria that were used. Moreover, matching was performed for the covariates sex, age, and adjustment to smoking to avoid confusion in the analyzes, once these factors are predictors to development of PD. In addition, the

analyses were made separately in smokers and non-smokers individuals to eliminate these confusion factor. Moreover, Bonferroni correction were applied to correct multiple test problems.

5. Conclusion:

The *IL33 rs7025417* polymorphism was associated with the risk for the development of periodontitis, while the *IL1RL1 rs3821204* was associated with protection against the disease in Brazilian individuals. No association was observed between *IL33 rs1929992* and *IL1RL1 rs11685424* polymorphisms. Regarding serum levels of IL-33, our data support the hypothesis that IL-33 is increase in patients with PD, however, the production is independent of the extent and severity of the disease.

Conflict of interest:

The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgments:

The authors would like to thank all those involved in the work, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária, and the Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá.

References

1. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent JRL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134–44.
2. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997;14:9–11.
3. Pihlstrom B, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal Diseases. *Lancet*. 2005;366(9499):1809–20.
4. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*. 2013;15:1–22.
5. Baek KJ, Choi Y, Ji S. Gingival fibroblasts from periodontitis patients exhibit inflammatory characteristics in vitro. *Arch Oral Biol*. 2013;58(10):1282–92.
6. Bloemen V, Schoenmaker T, de Vries TJ, Everts V. Direct Cell-Cell Contact Between Periodontal Ligament Fibroblasts and Osteoclast Precursors Synergistically Increases the Expression of Genes Related to Osteoclastogenesis. *J Cell Physiol*. 2010;222(3):565–73.
7. Graves D. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. *J Periodontol*. 2008;79(8s):1585–91.
8. Shiau HJ, Reynolds MA. Sex Differences in Destructive Periodontal Disease: A Systematic Review. *J Periodontol*. 2010;81(10):1379–89.
9. Sell AM, de Alencar JB, Visentainer JEL, e Silva C de O. Immunopathogenesis of Chronic Periodontitis. In: Arjunan P, editor. *Periodontitis - A Useful Reference*. Intech Open; 2017. p. 143–67.
10. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005;23(5):479–90.
11. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre D-A, Americh L, Aguilar L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(1):282–7.

12. Iwahana H, Yanagisawa K, Ito-kosaka A, Kuroiwa K, Tago K, Komatsu N, et al. Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. *Eur J Biochem.* 1999;264(2):397–406.
13. Tominaga SI, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Komatsu N. Presence and Expression of a Novel Variant Form of ST2 Gene Product in Human Leukemic Cell Line UT-7/GM. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;264(1):14–8.
14. Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev.* 2018;281(1):154–68.
15. Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein RA. IL-1 Receptor Accessory Protein and ST2 Comprise the IL-33 Receptor Complex. *J Immunol.* 2007;179(4):2551–5.
16. Gemmell E, Seymour GJ. Cytokine Profiles of Cells Extracted from Humans with Periodontal Diseases. *J Dent Res.* 1998;77(1):16–26.
17. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis ? *J Clin Periodontol.* 2011;38(Suppl. 38):60–84.
18. Dougall WC. Molecular Pathways : Osteoclast-Dependent and Osteoclast-Independent Roles of the RANKL / RANK / OPG Pathway in Tumorigenesis and Metastasis Pathway in Tumorigenesis and Metastasis. *Clin Cancer Res.* 2012;18(2):326–65.
19. Papachristou DJ, Basdra EK, Papavassiliou AG. Bone Metastases : Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Interventions. *Med Res Rev.* 2010;32(3):611–36.
20. Martin P, Talabot-ayer D, Seemayer CA, Vigne S, Lamacchia C, Rodriguez E, et al. Disease severity in K / BxN serum transfer-induced arthritis is not affected by IL-33 deficiency. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(1):1–14.
21. Palmer G, Talabot-ayer D, Toy D, Seemayer CA, Finckh A, Smith DE, et al.

- Inhibition of Interleukin-33 Signaling Attenuates the Severity of Experimental Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(3):738–49.
22. Chorley BN, Wang X, Campbell MR, Pittamn GS, Nouredine MA, Bell, Douglas A. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing technologies. *Mutat Res.* 2008;659(1–2):147–57.
 23. American Academy of Periodontology. The Pathogenesis of Periodontal Diseases. *J Periodontol.* 1999;70:457–70.
 24. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol.* 2018;45(Suppl 20):S149–61.
 25. Bergström J, Eliasson S, Dock J. A 10-Year Prospective Study of Tobacco Smoking and Periodontal Health. *J Periodontol.* 2000;71(8):1338–47.
 26. Cardozo DM, Guelsin GA, Clementino SL, de Melo FC, Braga MA, De Souza C, et al. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(6):651–6.
 27. Gauderman WJ. Sample size requirements for matched case-control studies of gene-environment interaction. *Stat Med.* 2002;21(1):35–50.
 28. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006;22(15):1928–9.
 29. Walter C, Kaye EK, Dietrich T. Active and passive smoking: Assessment issues in periodontal research. *Periodontol 2000.* 2012;58(1):84–92.
 30. Güncü GN, Tözüm TF, Çağlayan F. Effects of endogenous sex hormones on the periodontium - Review of literature. *Aust Dent J.* 2005;50(3):138–45.
 31. 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.
32. Lapérine O, Cloitre A, Caillon J, Huck O, Bugueno IM, Pilet P, et al. Interleukin-33 and RANK-L interplay in the alveolar bone loss associated to periodontitis. *PLoS One*. 2016;11(12):1–17.
 33. Schulze J, Bickert T, Beil FT, Zaiss MM, Albers J, Wintges K, et al. Interleukin-33 Is Expressed in Differentiated Osteoblasts and Blocks Osteoclast Formation From Bone Marrow Precursor Cells. *J Bone Miner Res*. 2011;26(4):704–17.
 34. Mun SH, Ko NY, Kim HS, Kim JW, Kim DK, Kim A-R, et al. Interleukin-33 stimulates formation of functional osteoclasts from human CD14 + monocytes. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(22):3883–92.
 35. Köseoğlu S, Hatipoğlu M, Sağlam M, , Enhoş S, Esen HH. Interleukin-33 could play an important role in the pathogenesis of periodontitis. *J Periodontal Res*. 2014;50(4):525–534.
 36. Saleh H, Eeles D, Hodge JM, Nicholson GC, Gu R, Pompolo S, et al. Interleukin-33, a target of Parathyroid Hormone and Oncostatin M, Increases Osteoblastic Matrix Mineral Deposition and Inhibits Osteoclast Formation in Vitro. *Endocrinology*. 2011;152(5):1911–22.
 37. Saidi S, Bouri F, Lencel P, Duplomb L, Baud'huin M, Delplace S, et al. IL-33 is expressed in human osteoblasts, but has no direct effect on bone remodeling. *Cytokine*. 2011;53(3):347–54.
 38. Lunderius-Andersson C, Enoksson M, Nilsson G. Mast cells respond to cell injury through the recognition of IL-33. *Front Immunol*. 2012;3(82):1–9.
 39. Verri WA, Souto FO, Vieira SM, Almeida SCL, Fukada SY, Xu D, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(9):1697–703.
 40. Wang JL, Liu J, Xie KG, Lan CG, Lu L, Tang YJ. Association between functional polymorphisms in IL-33/ST2 pathway and risk of osteosarcoma. *J Cell Mol Med*. 2018;22(8):3808–15.
 41. López-Mejías R, Genre F, Remuzgo-Martínez S, Robustillo-Villarino M, García-Bermúdez M, Llorca J, et al. Protective Role of the Interleukin 33 rs3939286

- Gene Polymorphism in the Development of Subclinical Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis Patients. *PLoS One*. 2015;10(11):1–8.
42. Wu F, Li L, Wen Q, Yang J, Chen Z, Wu P, et al. A functional variant in ST2 gene is associated with risk of hypertension via interfering MiR-202-3p. *J Cell Mol Med*. 2017;21(7):1–8.
 43. Leung BP, Xu D, Culshaw S, McInnes IB, Liew FY. A Novel Therapy of Murine Collagen-Induced Arthritis with Soluble T1/ST2. *J Immunol*. 2004;173(1):145–50.
 44. Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. *Immunity*. 2015;42(6):1005–19.
 45. Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Fröhlich A, Adelman K, Wohlfert EA, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature*. 2014;513(7519):564–8.
 46. Huang S, Lu F, Chen Y, Huang B, Liu M. Mast Cell Degranulation in Human Periodontitis. *J Periodontol*. 2013;84(2):248–55.
 47. Sakashita M, Yoshimoto T, Hirota T, Harada M, Okubo K, Osawa Y, et al. Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(12):1875–81.
 48. Wu H, Romieu I, Shi M, Hancock DB, Li H, Monge-Sienra JJ, et al. Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):321–7.
 49. Latiano A, Palmieri O, Pastorelli L, Vecchi M, Pizarro TT, Bossa F, et al. Associations between Genetic Polymorphisms in IL-33 , IL1R1 and Risk for Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One*. 2013;8(4):1–9.
 50. Chapuis J, Hot D, Hansmann F, Kerdraon O, Ferreira S, Hubans C, et al. Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer ' s disease. *Mol Psychiatry*. 2009;14(11):1004–16.
 51. Yu JT, Song JH, Wang ND, Wu ZC, Zhang Q, Zhang N, et al. Implication of IL-33 gene polymorphism in Chinese patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012;33(5):1014.e11-1014.e14.

52. Xu W, Liu Y, Ye D. Association between IL-33 Gene Polymorphisms (rs1929992, rs7044343) and Systemic Lupus Erythematosus in a Chinese Han Population. *Immunol Invest*. 2016;45(7):575–83.
53. Jafarzadeh A, Minaee K, Farsinejad A-R, Nematı M, Khosravimashizi A, Daneshvar H, et al. Evaluation of the circulating levels of IL-12 and IL-33 in patients with breast cancer: Influences of the tumor stages and cytokine gene polymorphisms. *Iran J Basic Med Sci*. 2015;18(12):1189–98.
54. Sağlam M, Köseoğlu S, Aral CA, Savran L, Pekbağrıyanık T, Çetinkaya A. Increased levels of interleukin-33 in gingival crevicular fluids of patients with chronic periodontitis. *Odontology*. 2016;105(2):184–90.
55. Sundnes O, Pietka W, Loos T, Sponheim J, Rankin AL, Pflanz S, et al. Epidermal expression and regulation of interleukin-33 during homeostasis and inflammation: Strong species differences. *J Invest Dermatol*. 2015;135(7):1771–80.
56. Tu X, Nie S, Liao Y, Zhang H, Fan Q, Xu C, et al. The IL-33-ST2L Pathway Is Associated with Coronary Artery Disease in a Chinese Han Population. *Am J Hum Genet*. 2013;93(4):652–60.

CAPÍTULO III

1. CONCLUSÕES

Os polimorfismos nos genes *IL33 rs7025417* e em *IL1RL1 rs3821204* foram associados à periodontite em indivíduos da população norte/nordeste do Paraná. O genótipo *IL33 rs7025417 C/C* foi associado a suscetibilidade da periodontite, ao passo que se observa efeito protetivo para o genótipo *IL1RL1 rs3821204 G/G*. Para os polimorfismos *IL33 rs1929992* e *IL1RL1 rs11685424* não foram observadas nenhuma associação com a patogênese da PD, mesmo após a estratificação por sexo, ou analisando separadamente a frequência alélica ou haplótipo formados.

Em relação aos níveis séricos, observa-se aumento da IL-33 em pacientes com PD quando comparado com controles, porém sem alterações dentro dos grupos de pacientes.

A comparação entre os genótipos de *IL33 rs1929992* e *IL33 rs7025417* e a produção de IL-33 também não foram estatisticamente significativas.

2. PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados obtidos neste estudo ao analisar a influência de polimorfismos em *IL33* e *IL1RL1* constatamos a importância da citocina e seu receptor na patogênese da PD. Apesar disso, para algumas análises dentro dos subgrupos fumantes e não fumantes, o baixo poder estatístico pode ser um fator limitante do estudo. Assim na tentativa de elucidar o papel desses polimorfismos, pretendemos aumentar o número de amostras. Ainda, sabe-se que existe uma relação entre a via IL-33/ST2 e o processo de reabsorção óssea e fazer uma análise com outros mediadores relacionados a esse processo parece ser importante. Por conta disso, um estudo de associação envolvendo os polimorfismos aqui estudados com SNPs nos genes de *RANKL* e *OPG* pode trazer melhores perspectivas sobre o assunto.

Da mesma forma que foi realizado a dosagem de IL-33 no soro dos indivíduos envolvidos nos estudos, pretendemos fazer a dosagem dos níveis séricos do receptor solúvel, sST2. Esses conhecimentos extras podem ajudar a compreensão dos mecanismos envolvidos na PD, e melhor os diagnósticos e prognóstico da doença.

ANEXOS

Quadro 1: Classificação da periodontite com base nos estágios definidos pela gravidade (de acordo com o nível de perda de inserção clínica interdental, perda óssea radiográfica e perda dentária), complexidade, extensão e distribuição.

Estágios da periodontite		Estágio I	Estágio II	Estágio III	Estágio IV
Severidade	CAL interdental no local de maior perda	1 a 2 mm	3 a 4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	Perda óssea radiográfica (RBL)	Terço coronal (<15%)	Terço coronal (15% a 33%)	Extensão para além do terço médio da raiz	Extensão para além do terço médio da raiz
	Perda do dente	Sem perda de dente devido à periodontite		Perda de dente devido a periodontite ≤ 4 dentes	Perda de dente devido a periodontite ≤ 5 dentes
Complexidade	Local	Profundidade máxima de sondagem ≤ 4 mm Principalmente perda óssea horizontal	Profundidade máxima de sondagem ≤ 5 mm Principalmente perda óssea horizontal	Além da complexidade do estágio II: Profundidade de sondagem ≥ 6 mm; perda óssea vertical ≥ 3 mm; envolvimento de furca Classe II ou III; defeito moderado na crista	Além da complexidade do estágio III: Necessidade de reabilitação complexa devido a: disfunção mastigatória, trauma oclusal secundário (grau de mobilidade dentária ≥ 2); defeito grave na crista; colapso da mordida; menos de 20 dentes restantes (10 pares opostos)
Extensão e distribuição	Adicionar o descritor de estágio	Para cada estágio, descreva a extensão como localizada (<30% dos dentes envolvidos), generalizada ou padrão molar/ incisivo			

O estágio inicial da periodontite deve ser determinado usando a perda de inserção clínica (CAL); se não estiver disponível, a perda óssea radiográfica (RBL) deve ser usada. As informações sobre a perda dentária que podem ser atribuídas principalmente à periodontite - se disponíveis - podem modificar a definição do estágio. Este é o caso mesmo na ausência de fatores de complexidade. Fatores de complexidade podem mudar o estágio para um nível mais alto, por exemplo, a furca II ou III mudaria para o estágio III ou IV independentemente de CAL. A distinção entre o estágio III e o estágio IV é baseada principalmente em fatores de complexidade. Por exemplo, um alto nível de mobilidade dentária e / ou colapso da mordida posterior indicaria um diagnóstico de estágio IV. Para qualquer caso, apenas alguns, não todos, os fatores de complexidade podem estar presentes; no entanto, em geral, é necessário apenas um fator de complexidade para deslocar o diagnóstico para um estágio superior. Deve ser enfatizado que essas definições de caso são diretrizes que devem ser aplicadas usando um julgamento clínico sólido para se chegar ao diagnóstico clínico mais adequado. Para pacientes pós-tratamento, CAL e RBL ainda são os determinantes do estágio primário. Se um fator de complexidade de deslocamento de estágio for eliminado por tratamento, o estágio não deve retroceder para um estágio inferior, uma vez que o fator de complexidade do estágio original deve sempre ser considerado no gerenciamento da fase de manutenção. **Fonte:** Adaptado de Papapanouet *al.*, 2018 (96).

Quadro 2: Classificação da periodontite com base em graus que refletem as características biológicas da doença, incluindo evidência de ou risco de progressão rápida, resposta prevista ao tratamento e efeitos na saúde sistêmica.

Graus da periodontite			Grau A: Baixa taxa de progressão	Grau B: Moderada taxa de progressão	Grau C: Rápida taxa de progressão
Critérios primários	Evidência direta de progressão	Dados longitudinais (RBL ou CAL)	Nenhuma evidência de perda em 5 anos	<2 mm em 5 anos	≥2 mm ao longo de 5 anos
	Evidência indireta de progressão	% perda óssea/ idade	<0,25	0,25 a 1,0	>1,0
		Fenótipo de caso	Grandes depósitos de biofilme com baixos níveis de destruição	Destruição proporcional aos depósitos de biofilme	A destruição excede as expectativas devido aos depósitos de biofilme; padrões clínicos específicos sugestivos de períodos de progressão rápida e/ ou doença de início precoce (por exemplo, padrão molar/ incisivo; falta de resposta esperada a terapias de controle bacteriano padrão)
Modificadores de grau	Fatores de risco	Tabagismo	Não fumante	<10 cigarros por dia	≥10 cigarros por dia
		Diabetes	Normoglicêmico/ Sem diagnóstico de diabetes	HbA1c <7,0% em pacientes com diabetes	HbA1c ≥7,0% em pacientes com diabetes

O grau deve ser usado como um indicador da taxa de progressão da periodontite. Os critérios primários são evidências diretas ou indiretas de progressão. Sempre que disponível, a evidência direta é usada; na sua ausência, a estimativa indireta é feita usando a perda óssea em função da idade no dente ou apresentação do caso mais afetado (perda óssea radiográfica expressa como porcentagem do comprimento da raiz dividido pela idade do sujeito, RBL / idade). Os médicos devem inicialmente presumir doença de grau B e buscar evidências específicas para mudar para grau A ou C, se disponível. Uma vez que o grau é estabelecido com base na evidência de progressão, ele pode ser modificado com base na presença de fatores de risco. CAL = perda de inserção clínica; HbA1c = hemoglobina glicada A1c; RBL = perda óssea radiográfica. **Fonte:** Adaptado de Papapanouet *al.*, 2018 (96).