

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/04/2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Marco Antonio Rimachi Hidalgo

Investigação da associação de polimorfismos no gene *Interleucina 17 Alfa* com o estado periodontal e perfil bioquímico do paciente

Araraquara

2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Marco Antonio Rimachi Hidalgo

Investigação da associação de polimorfismos no gene *Interleucina 17 Alfa* com o estado periodontal e perfil bioquímico do paciente

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Coorientadora: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico.

Araraquara

2020

Rimachi Hidalgo, Marco Antonio

Investigação da associação de polimorfismos no gene Interleucina 17 Alfa com o estado periodontal e perfil bioquímico do paciente / Marco Antonio Rimachi Hidalgo.-- Araraquara: [s.n.], 2020

65 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Coorientadora: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

1. Polimorfismo genético 2. Diabetes mellitus
3. Periodontite 4. Interleucina-17 I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB/5646
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Marco Antonio Rimachi Hidalgo

Investigação da associação de polimorfismos no gene *Interleucina 17 Alfa* com o estado periodontal e perfil bioquímico do paciente

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

2º Examinador: Profa. Dra. Gisele Faria

3º Examinador: Profa. Dra. Juliana Rico Pires

Araraquara, 10 de abril de 2020.

Dados Curriculares

Marco Antonio Rimachi Hidalgo

NASCIMENTO: 05 de maio de 1992 – Iquitos – Perú

FILIAÇÃO: Pedro Segundo Rimachi Inga
Rosario Hidalgo Gomes

2011/2016 Curso de Graduação em Odontologia- Faculdade de Odontologia (FOUNAP)-
Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP)

2018/2020 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em
Periodontia- Nível Mestrado – Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) –
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Agradeço especialmente...

A **Deus**, que sem ele nada poderia ter feito, já que sempre está presente em todos os momentos difíceis da minha vida, ele me dá saúde e graças a ele tenho uma maravilhosa família que amo muito.

Aos meus pais **Pedro e Rosario**, graças a eles, estou onde estou, pelo esforço e dedicação que eles dedicam para poder realizar meus estudos fora do meu país.

À minha orientadora **Profa. Dra. Raquel Scarel Caminaga**, por ter me aceito e acolhido em um momento tão importante da minha vida profissional. Muito obrigado por acreditar em mim sendo estrangeiro e não me conhecer muito, eu estou agradecido e valorizo muito essa ação e sobre tudo por toda paciência com que me orientou durante os dois anos. Mais do que isso, agradeço por criar uma verdadeira família dentro do laboratório de genética, um ambiente de trabalho movido a paz, companheirismo e amizade.

Às minhas amigas e amigos de laboratório **Thamiris Cirelli, Karen Rivera, Ingra G. Nicchio, Diego Bussanelli**, pessoal que definem nosso laboratório como amizade, companheirismo e honestidade. Agradeço a Deus por me colocar com o grupo maravilhoso de bons profissionais e pessoas.

À minha fiel companheira de toda a vida, minha parceira e quem faz meus dias muitos felizes, **Bonny Salva**, foi você que nos momentos difíceis, ficou ao meu lado, me entrego força, me ajudo, não tenho palavras para agradecer todas as coisas que você faz e deixa de fazer por mim, este trabalho é também seu. Tenho certeza da sua importância na minha vida.

Agradecimentos.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr-UNESP, na pessoa de sua Diretora-Profª. Dra. **Elaine Maria Sgavioli Massucato** e de seu Vice-Diretor Prof. Dr. **Edson Alves de Campos**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli** pela excelente formação dos alunos, dedicação, competência e empenho em suas atividades.

À **FAPESP**- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº2014/13295-1, 2016/03753-8, 2016/08070-6, 2016/18313-3, 2018/26367-1).

À **CAPES**: O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

Ao (**CNPq**)- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro à pesquisa.

A todos os **funcionários do Departamento de Morfologia**, especialmente Margarete e Marcelo, pela atenção e disponibilidade que sempre me atenderam.

Aos **funcionários da Biblioteca**, pela disposição de sempre.

Aos **Pacientes**, que colaboraram com a pesquisa, contribuindo com a realização dos exames clínicos e coletas. Muito obrigado

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.

“Nossa recompensa é encontrada no esforço e não no resultado ... Um esforço total é uma vitória completa”

Mahatma Gandhi

Rimachi Hidalgo MA. Investigação da associação de polimorfismos no gene *Interleucina 17 Alfa* com o estado periodontal e perfil bioquímico do paciente [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

Em todo o mundo continua-se a buscar evidências de suscetibilidade genética à periodontite (P) em diferentes populações, pois é importante levar em consideração as diferenças genéticas entre as diversas etnias. Além disso, também há grande interesse da comunidade científica em avaliar potenciais inter-relações entre a periodontite e alterações sistêmicas como o Diabetes Mellitus tipo 2 (T2DM, *type 2 Diabetes Mellitus*). Estudos enfocando polimorfismos genéticos são importantes principalmente para o entendimento que desempenham na modulação da resposta do hospedeiro frente à ação de micro-organismos periodontopatogênicos. O gene *Interleucina 17 Alfa* (*IL17A*), que codifica a citocina pró-inflamatória comumente referida como IL-17, é produzida por um subconjunto de células T auxiliaadoras (T helper) Th1/Th0 e secretada pelas células Th17, implicadas na vigilância imunológica nas superfícies mucosas e implicada na inflamação crônica. O objetivo deste estudo é investigar três polimorfismos no gene *IL17A* para avaliar se podem estar associados com a suscetibilidade genética à periodontite na presença (ou não) de T2DM, e relacioná-los com o perfil bioquímico e clínico periodontal do paciente. Considerando o cálculo amostral, foram investigados pacientes com T2DM e periodontite severa ou moderada (Grupo T2DM_P, n=199 pacientes); e para comparação dos resultados foram considerados pacientes sem T2DM com periodontite severa ou moderada (Grupo PERIODONTITIS, n=342), e também pacientes sem T2DM e sem periodontite ou periodontite leve, ou seja, pacientes saudáveis (Grupo HEALTHY, n=338), totalizando 879 indivíduos. Após exame periodontal completo foi obtido o bochecho de cada paciente para extração do DNA por Acetato de Amônio. Foram investigados três polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* - SNP) no gene *IL17A* por meio do sistema de genotipagem TaqMan utilizando PCR em tempo real. Uma parte dos pacientes realizaram exames bioquímicos do perfil glicêmico e lipídico. Após análise das frequências de alelos e genótipos por meio do software PLINK, foi avaliado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg de cada SNP. Os grupos foram comparados entre si, em relação às frequências alélicas e genótípicas realizando análises de regressão logística múltipla utilizando o programa STATA, e ajustando-se às variáveis idade, gênero, tabagismo e perfil bioquímico. Como resultado da comparação entre o grupo HEALTHY *versus* T2DM_P, a regressão logística múltipla estratificada para o hábito de fumar, demonstrou que pacientes fumantes com genótipo GG para o SNP rs3819024 do gene *IL17A* tinham maior chance de apresentar periodontite associado a T2DM (OR=6.60; IC 95%=1.31-33.01; p=0.02). Resultado semelhante foi obtido para pacientes fumantes na comparação PERIODONTITIS *versus* T2DM_P, indicando associação do genótipo GG com T2DM (OR=5.05; IC 95%=1.36-18.82; p=0.01). Por meio do software PLINK foi verificado o desequilíbrio de ligação entre cada SNP, constatando-se que os mesmos apresentavam-se como haplótipos. A distribuição dos haplótipos foi comparada entre os grupos por regressão logística múltipla demonstrando que indivíduos portadores do conjunto de haplótipos mais raros (<3%) eram mais suscetíveis a Periodontite juntamente com T2DM (OR=2.30; IC 95%=1.16-4.55, p=0.01), assim como ao T2DM isoladamente (OR=2.98; IC 95%=1.62-5.48, p=0.00). Conclui-se pelos resultados obtidos com pacientes fumantes e ex-fumantes que o SNP rs3819024 do gene *IL17A* demonstra associação com o diabetes mellitus tipo 2 isoladamente, e também como comorbidade da periodontite, no entanto o amplo intervalo de confiança observado indica que tal resultado necessita ser comprovado em uma população maior. A associação dos haplótipos raros com as patologias estudadas pode ser um resultado biologicamente espúrio, pois foi obtido

pela soma dos diferentes haplótipos raros, de modo que se um deles for considerado sozinho, a associação certamente será perdida, esclarecendo que o número de pacientes em cada grupo que carregam os haplótipos raros é menor do que o número calculado para obter o poder do estudo o que é normal.

Palavras-Chave: Polimorfismos genéticos. Diabetes Mellitus. Periodontite. Interleucina 17.

Rimachi Hidalgo MA. Polymorphisms in the *Interleukin 17 Alfa* and haplotypes investigation regarding periodontitis and type 2 diabetes mellitus [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Worldwide, evidence continues to be sought genetic susceptibility to periodontitis (P), because as genetic differences between different ethnicities tend to influence such susceptibility. Also, there is considerable interest from the scientific community to evaluate potential interrelationships between periodontitis and systemic pathologies such as Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM, Type 2 Diabetes Mellitus). Studies focusing on genetic polymorphisms are essential mainly for the understanding they play in modulating the host's response to the action of periodontopathogenic microorganisms. The Interleukin 17 Alpha (IL17A) gene, which encodes the proinflammatory cytokine commonly referred to as IL-17, is produced by a subset of Th1 / Th0 helper T cells (T helper) and secreted by Th17 cells, involved in immune surveillance in mucous surfaces and involved in chronic inflammation. The aim of this study is to investigate three polymorphisms in the IL17A gene to assess whether they may be associated with genetic susceptibility to periodontitis in the presence (or not) of T2DM and to relate them to the patient's biochemical and clinical periodontal profile. Considering the sample size, patients with T2DM and severe or moderate periodontitis were investigated (Group T2DM_P, n = 199 patients); and for comparison of results, patients without T2DM with severe or moderate periodontitis (Group PERIODONTITIS, n = 342) were considered, and also patients without T2DM and periodontitis or slight periodontitis, that is, healthy patients (HEALTHY Group, n = 338), totaling 879 individuals. After a complete periodontal examination, each patient's mouthwash was obtained for DNA extraction using Ammonium Acetate. Three single nucleotide polymorphisms (SNP) in the IL17A gene were investigated using the TaqMan genotyping system using real-time PCR. A portion of the patients underwent biochemical examinations of the glycemic and lipid profile. After analyzing the frequencies of alleles and genotypes using the PLINK software, the Hardy-Weinberg Balance of each SNP was evaluated. The groups were compared among themselves, about allele and genotypic frequencies, performing multiple logistic regression analyses using the STATA program, adjusting to variables such as age, gender, smoking, and biochemical profile. As a result of the comparison between the HEALTHY group versus T2DM_P, multiple logistic regression, stratified for smoking, demonstrated that smoking patients with GG genotype for SNP rs3819024 of the IL17A gene were more likely to have periodontitis associated with T2DM (OR=6.60; IC 95%=1.31-33.01; p=0.02). A similar result was obtained for smoking patients in the PERIODONTITIS versus T2DM_P comparison, indicating an association between the GG genotype and T2DM (OR=5.05; IC 95%=1.36-18.82; p=0.01). Using the Plink software, the linkage disequilibrium between each SNP was verified, verifying that they were presented as haplotypes. The distribution of haplotypes was compared between groups by multiple logistic regression demonstrating that individuals with the rarest set of haplotypes (<3%) were more susceptible to Periodontitis together with T2DM (OR=2.30; IC95%=1.16-4.55, p=0.01), as well as T2DM alone (OR=2.98; IC95%=1.62-5.48, p=0.00). In conclusion from the results obtained with smokers and ex-smokers that the SNP rs3819024 of the IL17A gene shows an association with type 2 diabetes mellitus alone, and also as a comorbidity of periodontitis, however, the wide confidence interval observed indicates that such a result needs to be proven in a larger population. The association of the rare haplotypes with the studied pathologies can be a biologically spurious result since it was obtained by the sum of the different rare haplotypes so that if one of them is considered alone, the association will certainly be lost, clarifying that the

number of patients in each group who carry the rare haplotypes is less than the amount calculated to obtain the power of the study, which is normal.

Keywords: Genetic Polymorphisms. Diabetes Mellitus. Periodontitis. Interleukin 17.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Doença Periodontal.....	12
1.2 Diabetes Mellitus (DM), Enfocado Principalmente o Tipo 2 (T2DM)	13
1.3 Resposta Imune do Tipo Th 17.....	15
1.4 Polimorfismos Genéticos.....	17
2 PROPOSIÇÃO.....	20
3 PUBLICAÇÃO	21
3.1 Artigo 1.....	21
4 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE A	54
ANEXO A.....	64

1 INTRODUÇÃO

Nesta sessão, apresentamos conceitos básicos e fundamentais, que contribuem como um primeiro passo para uma melhor compreensão da pesquisa.

1.1 Doença Periodontal

A Doença Periodontal (DP) é considerada uma doença complexa influenciada por fatores que podem afetar o risco de início da doença (fatores de risco) ou a progressão da doença existente (fatores de prognóstico)^{1,2}. A DP é considerada uma das doenças orais de origem infecciosa mais comuns que estão associadas à instalação do biofilme patogênico nas superfícies dos dentes e que pode desencadear uma resposta imune/inflamatória do hospedeiro^{3,4}. Assim, a microbiota periodontal complexa exerce um papel relevante na saúde periodontal ou na ocorrência de doenças periodontais³. Isto é, em um estado saudável encontra-se uma relação homeostática entre o corpo humano e a microbiota, mas num estado patológico pode acontecer uma modificação na abundância relativa de determinadas bactérias em comparação com a abundância na saúde⁵, resultando em uma disbiose da microbiota, e portanto o aparecimento da DP⁶. Está bem estabelecido na literatura que o fator etiológico primário da DP é a infecção do periodonto por microrganismos periodontopatogênicos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*^{7,8}.

A DP é iniciada com a gengivite, que é considerada uma condição reversível e não destrutiva⁹, cuja expressão clínica principal é inflamação do tecido gengival, desencadeada pela disbiose do biofilme microbiano, como já mencionado^{10,11}. A progressão da doença ocasiona danos ao periodonto de proteção (gengiva) e ao periodonto de sustentação (cimento, ligamento periodontal, e osso alveolar), evoluindo para a perda de inserção periodontal, presença de bolsas periodontais, caracterizando a periodontite^{11,12}. Epidemiologicamente a gengivite é a apresentação mais habitual da DP. Desde um enfoque do prognóstico, na inexistência de tratamento, a gengivite pode evoluir para periodontite, apesar de isso não ocorrer sempre^{4,13,14}.

Apesar de essenciais para a ocorrência da DP, as bactérias do biofilme envolvidas no desequilíbrio são insuficientes para sozinhas desencadear a doença. Atualmente é bem estabelecido que o dano tecidual gerado na DP é atribuído principalmente pela resposta do hospedeiro, e não pela ação bacteriana direta e de seus produtos^{15,16}. A função primordial da cascata inflamatória é proteger o organismo contra antígenos; porém, quando a resposta imune não é suficiente para eliminar os microrganismos invasores, a persistência de mediadores

inflamatórios contribui para gerar injúrias no tecido; que no caso da DP, aplica-se à destruição do ligamento periodontal e reabsorção de osso alveolar, podendo culminar na perda do elemento dentário¹⁷.

Diversos fatores relacionados ao hospedeiro, como fatores ambientais dentre eles o tabagismo, a presença de doenças sistêmicas e a carga genética têm sido estudados para compreender como participam para o início e progressão da DP¹⁸. A herança genética consegue explicar, em parte, porque a DP manifesta-se de diferentes formas clínicas na população¹⁹. Em um clássico estudo com gêmeos monozigóticos e dizigóticos foi estimado que há aproximadamente 50% de hereditariedade para o acometimento da periodontite crônica, mesmo após ajustes para variáveis comportamentais^{20,21}.

Assim como a DP, o Diabetes Mellitus tem sido conceituada como uma doença complexa (ou multifatorial), onde os fatores genéticos e ambientais executam um papel essencial na patogênese²⁰. Uma característica relevante das doenças complexas é o fato de serem poligênicas, ou seja, incontáveis genes encontram-se envolvidos na suscetibilidade da doença, cada qual assegurando uma pequena contribuição.

O tabagismo é reconhecido como um importante fator de risco relacionado ao estilo de vida para as DP²². A maioria das evidências científicas que relatam a associação entre o tabagismo e DP, são originados de estudos transversais²³, demonstrando mecanismos potenciais relevantes como o efeito do fumo que pode levar a uma mudança na composição do biofilme subgingival associado a um aumento na prevalência de patógenos periodontais²⁴. Além disso, o tabagismo tem sido implicado no atraso do recrutamento e migração de neutrófilos para os tecidos periodontais, comprometendo a resposta imune aguda²⁵. Esse fato aumentaria o limiar de agressão necessário ao tecido periodontal para iniciar a cascata inflamatória.²³

Como revisto por Leite et al.²³ (2018), o tabagismo tem um efeito prejudicial na incidência e progressão da DP, sendo a nicotina que é o principal ingrediente da fumaça do cigarro, um causador de aumentar a perda óssea alveolar e inibe a diferenciação de células do ligamento periodontal^{22,26}.

1.2 Diabetes Mellitus (DM), Enfocando Principalmente o Tipo 2 (T2DM)

O aumento da expectativa de vida, associada à uma modificação no estilo e/ou qualidade de vida, favoreceu a incidência de doenças degenerativas crônicas, destacando-se o DM que está aumentando a um ritmo alarmante, transformando-se em um problema mundial que carece de significativa assistência médica²⁷. A Federação Internacional de Diabetes calculou para 2013 que mais de 387 milhões de pessoas em todo o mundo são diagnosticadas com DM, e até 2035

essa quantidade aumentará para 592 milhões de pessoas, o que significa que 1:10 pessoas será afetada)²⁸.

O DM é um grupo de distúrbios clinicamente e geneticamente heterogêneos que afetam o metabolismo dos carboidratos em primeiro lugar, seguido dos lipídeos e, posteriormente, das proteínas²⁹⁻³¹. A característica mais comum do DM é uma elevação anormal dos níveis de glicose no sangue³², ou seja, a hiperglicemia, que é ocasionada por um déficit da secreção de insulina causada pela disfunção das células beta do pâncreas e/ou resistência à insulina no fígado e nos músculos³³. Como consequência direta da hiperglicemia e da instabilidade osmótica, uma tríade clínica clássica de sintomas é desenvolvida, e inclui polifagia, polidipsia e poliúria³⁰.

O surgimento da doença está relacionado a fatores de risco genéticos, ambientais e comportamentais³⁴. Os tipos mais comuns de DM é o tipo 1 (T1DM), quando o organismo que não consegue produzir a quantidade necessária de insulina porque as células beta do pâncreas são eliminadas por autoimunidade, e o tipo 2 (T2DM), que começa com uma resistência à insulina pois as células não respondem devidamente à insulina, e também à medida que a doença avança pode se desenvolver uma menor produção de insulina, mas sem reação autoimune^{30,35}. A principal causa do T2DM é o excesso de peso corporal e a falta de atividade física³⁵.

A relação entre a DM e DP aparece na literatura há mais de 70 anos³⁵⁻³⁷, sendo reportado numerosos estudos onde a população com diabetes tende a ter maior prevalência de DP mais severa que aquelas que não apresentam a doença, sendo o controle glicêmico um determinante fundamental nesta relação³⁸⁻⁴³. A periodontite pode ser reconhecida como a sexta maior complicação associada ao diabetes⁴⁴. Tem sido reconhecida uma relação bidirecional entre DM e DP⁴⁵, quer dizer que a DM não só é um fator de risco para a DP, quanto a DP pode ter um impacto negativo no controle glicêmico⁴⁶. Tal inter-relação é dada pela existência de citocinas pró-inflamatórias, bactérias e toxinas na DP que são liberadas localmente no tecido periodontal e entram na circulação sistêmica, influenciando tecidos e órgãos à distância. Ao mesmo tempo, as citocinas pró-inflamatórias sistemicamente implicadas no DM infiltram-se nos tecidos periodontais e pioram a condição periodontal^{36,47}. Deste modo, considera-se que a associação entre a DP e o DM pode ser consequência de dois mecanismos: 1) uma associação causal direta, em que as complicações da DM intervêm como modificadores da expressão da DP; 2) ou que as citocinas inflamatórias existentes na DP possam ocasionar a modificações no metabolismo da glicose e de lipídios⁴⁸.

Como revisto por Struch et al.⁴⁹ (2008), tendo em vista o primeiro mecanismo, encontram-se indícios de que a prevalência e a severidade da DP são mais altos em pessoas com diabetes em comparação aos que não apresentam diabetes^{36,39,47-50}. Foi verificado que indivíduos que apresentem um controle glicêmico adequado tem menor chance de destruição periodontal⁵¹.

O segundo mecanismo para associação entre a DP e o DM, quer dizer, que a DP pode ter influência sobre a condição sistêmica, foi demonstrado que a DP em conjunto com a endotoxemia e a bacteremia são capazes de aumentar os níveis séricos de citocinas como TNF- α , PGE2, IL-1 e IL-6. Lembrando que o tecido conjuntivo periodontal inflamado comporta-se como um receptor para esses mediadores, isso poderia fomentar em alterações no metabolismo dos lipídios e da glicose, contribuindo para a resistência insulínica⁵².

1.3 Resposta Imune do Tipo Th17

As citocinas são proteínas solúveis secretadas por células para atuar como mensageiro que transmite sinais para outras células⁵³. Elas são capazes de medir e controlar respostas autoimunes e inflamatórias e também podem regular o crescimento e a diferenciação celular. Um grupo amplo de células do organismo humano são capazes de produzir citocinas, como neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, linfócitos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais⁵⁴. Foi demonstrado que uma produção adequada de citocinas resulta em uma imunidade protetora, enquanto a produção inadequada de citocinas causa destruição dos tecidos e progressão de doenças⁵⁵. As células, ou linfócitos T com base em sua função são classificadas como células T auxiliares (do inglês, *helper*) (Th), células T-citotóxicas (TC) e células T-reguladoras (Treg)⁵⁶. O equilíbrio entre a resposta imune celular e humoral, por exemplo, é altamente regulada pelo equilíbrio entre subconjuntos de células Th1 e Th2⁵⁶. Em geral, aceita-se que o controle do equilíbrio Th1/Th2 é fundamental para a regulação da resposta imune presente na DP. Foi demonstrado que as lesões periodontais de natureza estável são mediadas por células Th1, e uma alteração nas células Th2 reflete a progressão da doença⁵⁷. Foi proposto que as lesões periodontais estáveis se assemelham a uma lesão de hipersensibilidade do tipo retardada mediadas pelas células Th1, mas a progressão da doença envolve um amplo número de células B influenciada pela resposta Th2⁵⁶. Em uma lesão estável, o IFN (interferon) aumenta a atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos para combater a infecção; mas no caso de uma resposta imune inata fraca adicionado a uma produção escassa de IL-12, uma resposta Th1 fraca pode não conter a infecção⁵⁶. Uma resposta inata forte, leva a uma resposta Th1 sob a influência das IL-12, IL-2 e IFN, mas se ocorrer uma resposta inata fraca, é ocasionada uma resposta Th2

sob influência da citocina IL-4⁵². A estimulação de mastócitos e a subsequente produção de IL-4 ajudam a induzir uma resposta de Th2, produção de anticorpos e também a ativação de células B⁵⁶.

A interleucina 17A, mais comumente referida como IL-17, foi o primeiro membro descrito da família IL-17⁵⁸, é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por células Th1/Th0, mas não por células Th2⁵⁶. IL-17 também é secretada por um subconjunto de células T CD4 diferenciadas, conhecidas como células T auxiliar (Th17)⁵⁹, entre outras fontes celulares que incluem células matadoras naturais (NK)⁶⁰.

A IL-17 tem várias funções que implicam tanto na proteção imunológica quanto na imunopatologia⁶¹, quer dizer, que a IL-17 desempenha um papel importante na vigilância imunológica nas superfícies mucosas e de barreira^{62,63}, mas também é implicada em cenários imunopatológicos de autoimunidade e inflamação crônica⁶⁴. A família IL-17 é formada por seis membros desde o IL-17A até IL-17F que compartilham homologia de sequência^{60,65-67}, com destaque para IL-17A e IL-17F, que além de exibir alta similaridade de sequência também podem formar homodímeros e heterodímeros para sinalização da resposta imune⁶². As células Th17 apresentam a capacidade de recrutar macrófagos e também neutrófilos para participar e potencializar a reação imune inflamatória, assim o dano tecidual parece ser intensificado pela proliferação e disfunção dessas células⁶⁸.

O fator transformador do crescimento (TGF)⁵⁶ e a IL-6 apresentam o potencial de induzir a diferenciação das células Th17. A IL-21 amplifica a frequência das células Th17 e a IL-23 ajuda a estabilizar o fenótipo das células Th17 previamente diferenciadas⁵⁶. A perda de qualquer membro dessa via (IL-6, IL-21 e IL-23), limita severamente a capacidade de resposta das células Th17⁵⁴. Foi demonstrado que a IL-17 estimula as células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, para produzir IL-6, IL-8 e prostaglandinas E2 (PGE2)⁵⁶. A PGE2 melhora a permeabilidade e dilatação dos vasos sanguíneos, produzindo vermelhidão e edema, além da capacidade de induzir a síntese de metaloproteínas da matriz (MMP), infiltrando monócitos⁵⁶. As MMPs contribuem para a degradação do tecido conjuntivo e destruição óssea osteoclástica, ambas características clássicas da DP⁵⁶. A IL-17 também é capaz de induzir o *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand* (RANKL) que é o principal fator estimulador da diferenciação e ativação dos osteoblastos⁶⁹. Por essas características fundamenta-se a hipótese da influência da IL-17 em lesões periodontais, a qual pode estar envolvida na modulação Th⁵⁶. A expressão de IL17 é mais elevada na periodontite que na gengivite, e é quase indetectável nos tecidos periodontais saudáveis⁷⁰⁻⁷². Muitos estudos demonstraram altos níveis de IL-17 na periodontite crônica e indicam uma correlação do aumento da expressão da IL-17 com a

severidade da doença e os parâmetros clínicos de destruição periodontal⁷³⁻⁷⁶. Além disso, foi demonstrado que existem células Th17 nas lesões periodontais⁷⁷ sendo a principal fonte de IL-17 na periodontite⁷⁸ no fluido gengival e saliva^{74,79}.

1.4 Polimorfismos Genéticos

Polimorfismos genéticos são formas variantes (alelos) de um locus específico do cromossomo, que coexistem naturalmente na população humana. São, portanto, variações normais do genoma humano, no qual o alelo mais raro ocorre com uma frequência maior que 1% na população. Os polimorfismos surgem como resultado de mutações, como inserções, deleções ou substituições de bases nucleotídicas, podendo gerar uma proteína não funcional ou alterar a expressão da referida proteína. O tipo de polimorfismo mais comumente relatado na literatura é o Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polymorphism - SNP*), que consiste em uma variação da identidade de um nucleotídeo singular num sítio particular do genoma⁸⁰.

Os haplótipos são combinações de alelos marcadores que estão localizadas juntas no mesmo cromossomo e que tendem a ser herdadas juntas⁸¹, compreendem SNPs ou outros marcadores as variantes no mesmo cromossomo que são herdados juntamente com poucas chances de recombinação contemporânea, o seja, recombinação durante a geração mais recente da meioses⁸².

Com a disponibilidade de marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único de alta densidade (SNP), os haplótipos desempenham um papel importante nos estudos de associação. Primeiro, os haplótipos são críticos para a compreensão do padrão de desequilíbrio de ligação (DL) no genoma humano, essencial para estudos de associação^{83,84}. Os haplótipos nos dizem diretamente como os alelos são organizados ao longo do cromossomo e refletem o padrão de herança sobre a evolução⁸⁵ forneceram um exemplo convincente para mostrar que a análise de DL baseada em haplótipos subjacentes pode ser muito mais clara. Segundo métodos baseados em haplótipos podem ser mais poderosos do que aqueles baseados em marcadores únicos em estudos de associação de mapeamento de genes complexos de doenças⁸¹.

As frequências dos genótipos e alelos podem variar entre grupos de pacientes doentes e saudáveis. Estudos relatam que variações alélicas, como os polimorfismos em genes que codificam citocinas, podem afetar a suscetibilidade e a progressão da DP^{17,86-89}. O primeiro estudo demonstrando a associação entre periodontite e um polimorfismo genético, no caso no gene *IL1*, foi de Kornman e colaboradores⁹⁰ em 1997. A partir de então, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de associar diversos polimorfismos em vários genes com a

periodontite. Existem mais de 14 milhões de SNPs distribuídos no genoma que têm sido investigados em associação a doenças, mas apenas uma pequena parcela destes foi estudado em relação à P⁹¹. Os primeiros estudos investigando a suscetibilidade genética à periodontite crônica na população Brasileira são de 2002, utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) aliada à de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP), ou seja, a PCR-RFLP⁹². A partir de então, várias outras pesquisas têm sido realizadas na população Brasileira a fim de identificar marcadores genéticos que possam estar associados com a suscetibilidade ou predisposição à P^{37,93-95}. Nota-se até os dias atuais uma tendência mundial em identificar marcadores genéticos de suscetibilidade à P, principalmente focando-se em genes relacionados ao sistema imunoinflamatório.

No caso da possível relação com o T2DM, é necessário incluir a avaliação rigorosa do controle glicêmico (e também lipídico) à avaliação periodontal. Para que um polimorfismo possa ser efetivamente considerado um marcador genético, é necessário realizarem-se estudos com populações maiores (com milhares de pessoas) e de diferentes etnias utilizando critérios clínicos padronizados. Somente isso poderá permitir comparações de resultados e efetivamente esclarecer se um determinado polimorfismo teria poder preditivo para uma doença em uma determinada população³⁷. Subsequentemente, quando um determinado alelo está associado com a doença, estudos enfocando a genética funcional podem ser realizados para investigar a possível influência do referido polimorfismo na expressão do gene e seu papel na etiologia e patogênese da doença^{96,97}. Afinal, um polimorfismo pode influenciar no nível de secreção de uma determinada proteína, provocando variações nas respostas imunológica e inflamatória individuais frente a uma agressão bacteriana⁹⁸.

Apesar de existirem vários estudos caso-controle e meta-análises enfocando a associação de polimorfismos genéticos com a periodontite, mais estudos ainda se fazem necessários, pois: as frequências dos alelos polimórficos variam entre as diferentes etnias, variando também os resultados de suscetibilidade a doenças^{99,100}. Portanto, um determinado polimorfismo que tenha sido previamente associado à uma doença precisa ser validada na nossa população.

Pelo papel que desempenham na modulação da resposta do hospedeiro frente à ação de microrganismos periodontopatogênicos, alguns genes como o gene *IL17*, que codifica a interleucina-17 Alfa (IL-17A), foram pouco pesquisados até o momento com relação à patogênese da DP¹⁰¹. Um polimorfismo específico no gene *IL17A* (rs2275913), está associado ao risco significativamente elevado de desenvolvimento e severidade de doenças inflamatórias¹⁰²⁻¹⁰⁴. Esse mesmo polimorfismo rs2275913 foi investigado em uma população

brasileira do Nordeste, e associou o alelo A com maior suscetibilidade à periodontite¹⁰⁵. No entanto, mais estudos são necessários tanto na população brasileira, quanto em outras etnicamente diferentes, e em maior número, investigando inclusive outros polimorfismos no gene *IL17A*, para compreender melhor sua possível influência no desenvolvimento da periodontite.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que pacientes fumantes e ex-fumantes homozigotos para o genótipo GG do SNP rs3819024 do gene *IL17A*, apresentaram maior chance de desenvolver diabetes mellitus tipo 2 isoladamente, ou em conjunto com a periodontite como comorbidade, após análise de regressão logística múltipla, ajustada para sexo e idade. No entanto, mediante o amplo intervalo de confiança observado nessas análises, tal resultado necessita ser comprovado em uma população maior. Também, a associação dos haplótipos raros com as doenças estudadas pode ser um resultado biologicamente espúrio, pois foi obtido pela soma dos diferentes haplótipos raros, de modo que se um deles for considerado sozinho, a associação certamente será perdida.

REFERENCIAS*

1. Chapple IL, Bouchard P, Cagetti MG, Campus G, Carra MC, Cocco F et al. Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2017; 44 Suppl 18: S39-S51.
2. Baelum V, Lopez R. Periodontal epidemiology: towards social science or molecular biology? *Community Dent Oral Epidemiol*. 2004; 32(4): 239-49.
3. Vieira Colombo AP, Magalhaes CB, Hartenbach FA, Martins do Souto R, Maciel da Silva-Boghossian C. Periodontal-disease-associated biofilm: a reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog*. 2016; 94: 27-34.
4. Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, Mummolo S, Gatto R, Tete S, et al. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutrition & metabolism*. 2012; 9(1): 88.
5. Pinto G, Silva MD, Peddey M, Sillankorva S, Azeredo J. the role of bacteriophages in periodontal health and disease. *Future Microbiology*. 2016; 11: 1359-69.
6. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10(10): 717-25.
7. Andriankaja OM, DeNardin E, Dunford R, Dorn J, Trevisan M. The association between metabolic syndrome and periodontal disease. *Am J Epidemiol*. 2006; 163(11): S30-S.
8. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(3): 196-205.
9. Harvey JD. periodontal Microbiology. *Dent Clin North Am*. 2017; 61(2): 253-69.
10. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17038.
11. Adams DF. The American Academy of Periodontology. *J Periodontology*. 1996; 67(2): 177-9.
12. 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1): i, 1-112.
13. Ammons WF, Schectman LR, Page RC. Host tissue response in chronic periodontal disease. 1. The normal periodontium and clinical manifestations of dental and periodontal disease in the marmoset. *J Periodontal Res*. 1972; 7(2): 131-43.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

14. Chapple IL, Van der Weijden F, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, et al. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2015; 42 Suppl 16: S71-6.
15. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(3): 196-205.
16. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone Loss in Experimental Periodontitis. *The J Immunol*. 1998; 160(1): 403-9.
17. Franch-Chillida F, Nibali L, Madden I, Donos N, Brett P. Association between interleukin-6 polymorphisms and periodontitis in Indian non-smokers. *J Clin Periodontol*. 2010; 37(2): 137-44.
18. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*. 1997; 14(1): 9-11.
19. Susin C, Vecchia CFD, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol*. 2004; 75(7): 1033-41.
20. 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.
21. Candel-Martí M-E, Flichy-Fernández A-J, Alegre-Domingo T, Ata-Ali J, Peñarrocha-Diago MA. Interleukins IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and periimplant disease. an update. *Medicina oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*. 2011; 16(4): e518-21.
22. Kubota M, Yanagita M, Mori K, Hasegawa S, Yamashita M, Yamada S et al. The effects of cigarette smoke condensate and nicotine on periodontal tissue in a periodontitis model mouse *Plos one* 2016; 11(5): e0155594.
23. Leite FRM, Nascimento GG, Scheutz F, Lopez R Effect of smoking on periodontitis: a systematic review and meta-regression. *Am J Prev Med*. 2018; 54(6): 831-41.
24. Schipkova AY, Nagaraja HN, Kumar PS. Subgingival microbial profiles of smokers with periodontitis *J Dent Res*. 2010; 89(11): 1247-53.
25. Soder B, Jin LI, Wickholm S Granulocyte elastase, Matrix metalloproteinase-8 and prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in smokers and non smokers with persistent periodontitis *J Clin Periodontol* 2002; 29(5): 384-91.
26. Yanagita M, Kojima Y, Kawahara T, Kajikawa T, Oohara H, Takedachi M et.al suppressive effects of nicotine on the cytodifferentiation of murine periodontal ligament cells. *Oral Dis*. 2010; 16(8): 812-7
27. Nery C, De Moraes SRA, Novaes KA, Bezerra MA, Silveira PVDC, Lemos A. Effectiveness of resistance exercise compared to aerobic exercise without insulin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Braz J Phys Ther*. 2017; 21(6): 400-15.

28. Group IDA. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF diabetes atlas: estimates for the year 2013. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015; 109(3): 461-5.
29. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2007; 44(1): 127-53.
30. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998; 15(7): 539-53.
31. Abdel-Moneim A, Bakery HH, Allam G. The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2018; 101: 287-92.
32. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal Diseases. *J Periodontol.* 2006; 77(8): 1289-303.
33. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.* 2017; 40(Supplement 1): S11-S24.
34. King GL, Shiba T, Oliver J, Inoguchi T, Bursell S-E. Cellular and molecular abnormalities in the vascular endothelium of diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 1994; 45(1): 179-88.
35. Tao Z, Shi A, Zhao J. Epidemiological perspectives of diabetes. *Cell Biochem Biophys.* 2015; 73(1): 181-5.
36. Taylor HG, Yeates KO, Wade SL, Drotar D, Stancin T, Burant C. Bidirectional child-family influences on outcomes of traumatic brain injury in children. *J Int Neuropsych Soc.* 2001; 7(6): 755-67.
37. Oliveira RN CS, Bastos AS, Orrico SRP, Scarel-Caminaga RM. Doença periodontal em pacientes com diabetes mellitus: influência de polimorfismos genéticos? *Rev Odontol UNESP.* 2011; 40(4): 187-94.
38. Seppälä B, Ainamo J. A site-by-site follow-up study on the effect of controlled versus poorly controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1994; 21(3): 161-5.
39. Papapanou PN. periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol.* 1996; 1(1): 1-36.
40. Mealey BL, Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontology* 2000. 2003; 32(1): 59-81.
41. Lu HK, Yang PC. Cross-sectional analysis of different variables of patients with non-insulin dependent diabetes and their periodontal status. *The Int J Periodontics & Restorative Dent.* 2004; 24(1): 71-9.
42. Mealey BL, Oates TW, american academy of P. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol.* 2006; 77(8): 1289-303.
43. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol.* 1996; 1(1): 1-36.

44. Loe H. Periodontal disease. the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1993; 16(1): 329-34.
45. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol*. 2001; 6(1): 99-112.
46. Preshaw P, Alba A, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012; 55(1): 21-31.
47. Xiao LM, Yan YX, Xie CJ, Fan WH, Xuan DY, Wang CX, et al. Association among interleukin-6 gene polymorphism, diabetes and periodontitis in a chinese population. *Oral Dis*. 2009; 15(8): 547-53.
48. Correia D, Alcoforado G, Mascarenhas P. Influência da diabetes mellitus no desenvolvimento da doença periodontal. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac* 2010; 51: 167-76
49. Struch F, Dau M, Schwahn C, Biffar R, Kocher T, Meisel P. Interleukin-1 gene polymorphism, diabetes, and periodontitis: results from the study of health in Pomerania (SHIP). *J Periodontol*. 2008; 79(3): 501-7.
50. Guzman S, Karima M, Wang HY, Van Dyke TE. Association between interleukin-1 genotype and periodontal disease in a diabetic population. *J Periodontol* 2003; 74(8): 1183-90.
51. Ervasti T, Knuuttila M, Pohjamo L, Haukipuro K. Relation between control of diabetes and gingival bleeding. *J Periodontol*. 1985; 56(3): 154-7.
52. Verardi G, Lupatini A, Beltrame J, Trentin M, Oliveira Da Silva S, De Carli J. Doença periodontal e diabete melito tipo 2. *Revista Odonto*. 2009; 17: 93-9.
53. CHAUDHARI HL, WARAD S, ASHOK N, BAROUDI K, TARAKJI B. Association of interleukin-17 polymorphism (-197G/A) in chronic and localized aggressive periodontitis. *Braz Oral Res* 2016; 30.
54. Pradeep AR, Hadge P, Chowdhry S, Patel S, Happy D. Exploring the role of Th1 cytokines: interleukin-17 and interleukin-18 in periodontal health and disease. *J Oral Science*. 2009; 51(2): 261-6.
55. Özçaka Ö, Nalbantsoy A, Buduneli N. Interleukin - 17 and interleukin - 18 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2011; 46(5): 592-8.
56. Jayakumar Sunandhakumari V, Sadasivan A, Koshi E, Krishna A, Alim A, Sebastian A. Effect of nonsurgical periodontal therapy on plasma levels of IL-17 in chronic periodontitis patients with well controlled type-II diabetes mellitus—a clinical study. *Dent J*. 2018; 6(2): 19.
57. Yücel ÖÖ, Berker E, Gariboğlu S, Otlı H. Interleukin-11, interleukin-1 β , interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *J Clinical Periodontol*. 2008; 35(5): 365-70.

58. Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *The J Experimental Medicine*. 1993; 177(1): 195-200.
59. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005; 6(11): 1123-32.
60. Patel DD, Kuchroo VK. Th17 cell pathway in human immunity: lessons from genetics and therapeutic interventions. *Immunity*. 2015; 43(6): 1040-51.
61. Abusleme L, Moutsopoulos N. IL-17: Overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral Dis*. 2017; 23(7): 854-65.
62. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012; 11(10): 763-76.
63. Song X, He X, Li X, Qian Y. The roles and functional mechanisms of interleukin-17 family cytokines in mucosal immunity. *Cellular & Molecular Immunology*. 2016; 13(4): 418-31.
64. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14: 585.
65. Moseley T, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & Growth Factor Revi*. 2003; 14(2): 155-74.
66. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin J, Lee J, Cai L, Risser P, et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J*. 2001; 20(19): 5332-41.
67. Witowski J, Książek K, Jörres A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2004; 61(5): 567-79.
68. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in chinese chronic periodontitis patients. *J Clinical Periodontol*. 2011; 38(6): 509-16.
69. Van Bezooijen RL, Farih-Sips HCM, Papapoulos SE, Löwik CWGM. Interleukin-17: a new bone acting cytokine in vitro. *J Bone Miner Res*. 1999; 14(9): 1513-21.
70. Honda T, Aoki Y, Takahashi N, Maekawa T, Nakajima T, Ito H, et al. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Chim Acta*. 2008; 395(1-2): 137-41.
71. Okui T, Aoki Y, Ito H, Honda T, Yamazaki K. The presence of IL-17⁺/FOXP3⁺ double-positive cells in periodontitis. *J Dent Res*. 2012; 91(6): 574-9.
72. Moutsopoulos NM, Kling HM, Angelov N, Jin W, Palmer RJ, Nares S, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J Autoimmunity*. 2012; 39(4): 294-303.
73. Zenobia C, Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin - 17 in immunity and inflammation. *Periodontology 2000*. 2015; 69(1): 142-59.

74. Johnson R, Wood N, Serio F. Interleukin - 11 and IL - 17 and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*. 2004; 75(1): 37-43.
75. Lester SR, Bain JL, Johnson RB, Serio FG. Gingival concentrations of interleukin - 23 and - 17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss. *J Periodontol*. 2007; 78(8): 1545-50.
76. Dutzan N, Vernal R, Vaque JP, García - Sesnich J, Hernandez M, Abusleme L, et al. Interleukin - 21 expression and its association with proinflammatory cytokines in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol*. 2012; 83(7): 948-54.
77. Cardoso C, Garlet G, Crippa G, Rosa A, Junior W, Rossi M, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24(1): 1-6.
78. Dutzan N, Konkel JE, Greenwell-Wild T, Moutsopoulos NM. Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal Immunol*. 2016; 9(5): 1163.
79. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W. Effect of non - surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(6): 509-16.
80. Taylor JJ, Preshaw PM, Donaldson PT. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004; 35: 158-82.
81. Liu N, Zhang K, Zhao H. Haplotype - association analysis. *Adv Genet*. 2008; 60: 335-405.
82. Stram DO. Multi-SNP haplotype analysis methods for association analysis. *Methods Mol Biol*. 2017; 1666: 485-504.
83. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet*. 2002; 3(4): 299-309.
84. Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *TRENDS Genet*. 2002; 18(1): 19-24.
85. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet*. 2001; 29(2): 229-32.
86. Grigoriadou ME, Koutayas SO, Madianos PN, Strub JR. Interleukin-1 as a genetic marker for periodontitis: review of the literature. *Quintessence Int. Dent Dig* 2010; 41(6): 517-25.
87. Kim YJ, Viana AC, Curtis KMC, Orrico SRP, Cirelli JA, Scarel-Caminaga RM. Lack of association of a functional polymorphism in the Interleukin 8 gene with susceptibility to periodontitis. *DNA Cell Biol*. 2009; 28(4): 185-90.
88. Lopez NJ, Jara L, Valenzuela CY. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. *J Periodontol*. 2005; 76(2): 234-43.
89. Tervonen T, Raunio T, Knuuttila M, Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *J Clin Periodont*. 2007; 34(5): 377-83.

90. Kornman KS, Crane A, Wang HY, diGiovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997; 24(1): 72-7.
91. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001; 409(6822): 928-33.
92. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SR. Frequencies of the -330 (T --> G) IL-2 and -590 (T --> C) IL-4 gene polymorphisms in a population from south-eastern Brazil. *Eur Journal Immunogenet: official J of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics.* 2002; 29(4): 293-6.
93. Astolfi CM, Shinohara AL, da Silva RA, Santos MCLG, Line SRP, de Souza AP. Genetic polymorphisms in the MMP-1 and MMP-3 gene may contribute to chronic periodontitis in a brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2006; 33(10): 699-703.
94. Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of brazilian individuals. *J Periodontal Res.* 2007; 42(1): 23-30.
95. Pontes CC, Gonzales JR, Novaes AB, Jr., Taba Junior M, Grisi MF, Michel J, et al. Interleukin-4 gene polymorphism and its relation to periodontal disease in a brazilian population of african heritage'. *J Dent.* 2004; 32(3): 241-6.
96. Schafer AS, Jepsen S, Loos BG. Periodontal genetics: a decade of genetic association studies mandates better study designs. *J Clin Periodontol.* 2011; 38(2): 103-7.
97. Vijayalakshmi R, Geetha A, Ramakrishnan T, Emmadi P. Genetic polymorphisms in periodontal diseases: an overview. *Indian J Dent Res : Official publication of Indian Society for Dental Research.* 2010; 21(4): 568-74.
98. Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol.* 1998; 3(1): 327-38.
99. Stabholz A, Soskolne WA, Shapira L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000.* 2010; 53: 138-53.
100. Holla LI, Fassmann A, Stejskalova A, Znojil V, Vanek J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2004; 75(1): 30-6.
101. Correa JD, Madeira MFM, Resende RG, Correia-Silva JD, Gomez RS, de Souza DD et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and-17F genes and chronic periodontal disease. *Mediat Inflamm.* 2012; 2012: 846052.
102. Shibata T, Tahara T, Hirata I, Arisawa T. genetic polymorphism of interleukin-17A and-17F genes in gastric carcinogenesis. *Hum Immunol.* 2009; 70(7): 547-51.
103. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *J Clinical Immunol.* 2008; 28(1): 44-9.

- 104.Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, et al. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PloS one*. 2011; 6(10): e26229.
- 105.Zacarias JMV, Sippert EÂ, Tsuneto PY, Visentainer JEL, Sell AM. The influence of interleukin 17A and IL17F polymorphisms on chronic periodontitis disease in Brazilian patients. *Mediat Inflamm*. 2015; 2015: 147056. doi: 10.1155/2015/147056.
- 106.Miyake Y, Tanaka K, Arakawa M. IL3 rs40401 polymorphism and interaction with smoking in risk of asthma in japanese women: the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health study. *Scand J Immunol*. 2014; 79(6): 410-4.
- 107.Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G. Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007; 39(2):175-91.
- 108.Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005; 21(2): 263-5.
- 109.Wang J, Shete S. Testing departure from hardy–weinberg proportions. In: Elston RC, Satagopan JM, Su S, editors. *Statistical human genetics*: New York: Springer; 2012. p. 77-102.