

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR: UMA ABORDAGEM CRÍTICA EM RELAÇÃO À PESQUISA EM PERIODONTOLOGIA

Molecular epidemiology: a critical review related to periodontal research

Sheila Cavalcá Cortelli¹, José Roberto Cortelli¹, Marcelo Werneck Barata de Araujo², Renato Zanotta Rebelo³, Fernando de Oliveira Costa⁴

RESUMO

A epidemiologia é uma ciência básica para a investigação clínica. Assim, se torna crucial para o desenvolvimento de estudos significativos sobre a história natural de uma doença, sobre a qualidade de métodos diagnósticos, avaliações de risco e a efetividade de intervenções clínicas. Uma grande evolução nos delineamentos epidemiológicos tem sido observada nos últimos anos dentro da periodontologia. E, é neste contexto de evolução que se insere a epidemiologia molecular, que, pelo monitoramento de biomarcadores, permite uma compreensão mais detalhada dos eventos biológicos envolvidos na etiopatogênese das doenças. Técnicas como PCR, PCR em tempo real e hibridização com sondas de DNA, têm sido empregadas em epidemiologia molecular elucidando questões e apresentando impacto direto sobre diferentes aspectos da periodontologia. Na verdade a epidemiologia molecular substituiu o panorama dominado pelas teorias mais simplistas por modelos mais complexos de doença que associam fatores do hospedeiro, ambientais e causais. É claro que a visão sobre o que representa a epidemiologia molecular pode variar amplamente. Todavia, benefícios específicos podem ser a ela atribuídos principalmente no que se refere a identificação precoce de eventos associados à história natural da doença e determinação mais precisa de indivíduos ou grupos de risco. Após análise da literatura pode-se concluir que a epidemiologia molecular parece ser uma importante ferramenta no controle dos vieses associados aos modelos de estudo tradicionais. Sua contribuição pode tornar a pesquisa epidemiológica um instrumento mais apurado e, conseqüentemente, fornecer dados imprescindíveis na formação de uma base racional consistente para as investigações clínicas.

UNITERMOS: estudos epidemiológicos, técnicas de diagnóstico molecular, marcadores biológicos, periodontia. R Periodontia 2007; 17:07-14.

¹ Professores assistentes e doutores de periodontia - UNITAU

² Johnson & Johnson Consumer & Personal Products Worldwide Division of Johnson & Johnson Consumer Companies, Inc., Morris Plains, NJ, USA

³ Aluno do programa de pós-graduação em odontologia, nível mestrado - UNITAU

⁴ Professor adjunto de periodontia - UFMG

Recebimento: 19/11/06 - Correção: 27/02/07 - Aceite: 07/03/07

INTRODUÇÃO

O contexto social e científico mutante no qual a pesquisa epidemiológica vem sendo conduzida levou a novos desafios para aqueles que trabalham com epidemiologia, se utilizam de seus resultados, e para o meio acadêmico em geral. O grande desafio da pesquisa epidemiológica continua sendo o de aumentar incansavelmente os nossos conhecimentos da biologia e da patogênese das doenças para melhorar a saúde humana, prevenir e tratar doenças. Entretanto, em ciência é impossível abordar o futuro sem se reportar ao passado, mesmo que recente. As doenças em geral evoluem ao longo do tempo. O estado de saúde parece evoluir com o desaparecimento de certas moléstias, mas, em contrapartida o estado de doença também parece evoluir à medida que surgem novas enfermidades. Todavia, deve-se considerar que nem sempre o que se observa é o aparecimento de novas doenças. Por vezes, o que ocorre é a descoberta de aspectos até então não revelados. Deste modo fica evidente que, para se manter adequada, a epidemiologia requer mudanças constantes embora estas possam ocorrer lentamente.

Como a epidemiologia é considerada uma ciência básica da investigação clínica, sua completa compreensão se torna crucial para o desenvolvimento de estudos significativos da história natural de uma

doença, da qualidade de diferentes métodos diagnósticos, da correta avaliação de riscos e da efetividade de intervenções clínicas. Nos estudos epidemiológicos, em relação às validações de risco, um problema fundamental ocorre nas medições de exposições, que até então, têm utilizado todas as fontes e medidas indiretas. Assim, os resultados de estudos diferentes quanto ao risco de doenças apresentam muita heterogeneidade, dependendo do tipo de medição de exposição usado. Por causa destes problemas para se medir exposição, o uso de marcadores biológicos de exposições tem despertado atualmente muita atenção no meio científico, crescendo o interesse na denominada epidemiologia molecular ou epidemiologia bioquímica.

Na visão dos epidemiologistas, "epidemiologia bioquímica ou molecular" é a incorporação de biomarcadores na pesquisa epidemiológica analítica. Esta revolução no conhecimento biológico possibilitou identificar biomarcadores em níveis moleculares, e esta precisão permitiu o aprimoramento e desenvolvimento de modelos de compreensão da causalidade das doenças. Este avanço da ciência em nível molecular aumentou muito o conhecimento sobre as doenças genéticas, incluindo o mapeamento de genes responsáveis pela herança mendeliana e desenvolvimento de modelos de predição principalmente para as doenças crônicas, que até então apresentavam explicações etiopatogênicas limitadas para comprovar causalidade.

É neste contexto que se insere a epidemiologia molecular, fundamentada na utilização de metodologia especializada capaz de monitorar biomarcadores. Em 1987, a *NATIONAL RESEARCH COUNCIL* definiu como biomarcadores os indicadores bioquímicos, genéticos, moleculares, imunológicos e fisiológicos capazes de refletir eventos ocorridos nos diversos sistemas biológicos. Por isso, esta não é uma nova ciência e sim uma nova percepção das possíveis causas de doença. A epidemiologia molecular substitui o panorama dominado pelas teorias mais simplistas por modelos mais complexos de doença que associam fatores do hospedeiro, ambientais e causais (NUNN, 2003).

Adicionalmente, muitos epidemiologistas defendem a idéia de que no futuro o progresso da pesquisa epidemiológica apenas se dará pela elucidação dos mecanismos biológicos, o que comprovaria as relações causais em epidemiologia. Entretanto, deve-se considerar que este pensamento pode induzir a redução errônea do espectro da compreensão global do processo causal. Adotar a evidência biológica como fonte exclusiva de hipóteses epidemiológicas pode enfraquecer as hipóteses geradas pelos dados descritivos, intuitivos ou ainda decorrentes da observação clínica. E, certamente os estudos epidemiológicos são viáveis mesmo que os mecanismos não sejam compreendidos em parte ou em sua totalidade. Certas situações de risco ou proteção são muitas vezes difíceis de serem simuladas em laboratório, embora possam ter grande importância para a saúde pública. Assim, a

conjunção dos achados biológicos advindos da epidemiologia molecular com os delineamentos epidemiológicos tradicionais pode contribuir para a complexa elucidação das relações causais e pode também contribuir para o entendimento da história natural das doenças. Neste sentido, o presente artigo oferece uma abordagem crítica sobre o avanço do conhecimento em epidemiologia molecular e, particularmente a sua utilização e impacto na pesquisa periodontal.

Estudos epidemiológicos e análises moleculares

A visão sobre o que representa a epidemiologia molecular pode variar amplamente. Para o epidemiologista pode representar simplesmente qualquer estudo que envolva medidas biológicas. Porém, para o geneticista pode ser sinônimo de pesquisas relacionadas aos genes responsáveis pelo desenvolvimento de patologias raras. Mas, e para a pesquisa periodontal ou particularmente para a próprio periodontista? O importante não é apenas definir e sim identificar e aplicar os conhecimentos derivados da epidemiologia molecular. Por exemplo, na década de 60 já havia estudos que tentavam relacionar o hábito de fumar com a doença periodontal (WAERHAUG, 1967). Nesta época, os dados se restringiam às associações observadas nos estudos transversais cuja confirmação não era determinada em estudos longitudinais. Mas, o advento das técnicas moleculares propiciou resultados mais confiáveis (RIVERA-HIDALGO, 2003) suportados pela dosagem de nicotina no sangue, avaliação dos efeitos dos componentes do cigarro sobre cultura de células, etc. E, é assim que nos dias atuais cabe a profissionais ligados à periodontia instruir a população no que se refere aos malefícios do hábito bem como contra-indicar determinados procedimentos clínicos aos consumidores de tabaco.

Os estudos moleculares por meio da utilização de biomarcadores, permitiram uma compreensão avançada do evento biológico na etiopatogenia das doenças. Embora, a incorporação de biomarcadores à epidemiologia tradicional não seja uma novidade, o aprimoramento técnico da genética e biologia molecular tem oferecido maiores e melhores oportunidades para sua aplicação. De acordo com BOFFETTA (2000), duas áreas aderiram extensamente às análises moleculares. Uma delas é a epidemiologia cardiovascular e a outra, de interesse ainda mais direto ao periodontista, é a epidemiologia das doenças infecciosas. Além destas, merece destaque o enorme trabalho englobando questões relativas ao câncer. Embora insuficiente para caracterizar uma doença quando utilizados isoladamente, o monitoramento de biomarcadores tem demonstrado trazer benefícios para a pesquisa epidemiológica (**quadro 1**).

A vantagem do uso de biomarcadores é que estes podem superar o problema de uma memória limitada ou falta de

consciência de uma exposição (viés de memória). Além disso, os biomarcadores podem superar erros resultantes da variação na absorção ou no metabolismo individual enfocando um passo posterior na cadeia causal. Assim, os biomarcadores nos deixam próximo de poder mensurar uma exposição em um estágio específico do processo saúde-doença humana (GORDIS, 2000).

A aplicação de biomarcadores como variáveis biológicas traz à tona a necessidade de adaptações dos delineamentos experimentais, das coletas sistemáticas de dados e principalmente das análises estatísticas vistas outrora em epidemiologia. Entretanto, alguns problemas clássicos se mantêm, e o viés de seleção parece ser um deles. Quando se estudam alterações genéticas ou polimorfismos metabólicos muitas vezes pode ser difícil estabelecer os critérios de seleção, pois, supõe-se que muito provavelmente os participantes não irão apresentar relação direta com o evento estudado. Mas, a seleção inadequada de participantes ou utilização inapropriada de grupos controle pode fazer com que algumas hipóteses não sejam posteriormente confirmadas. Em periodontia, este fato pode ser ilustrado com estudos que abordam medicina periodontal (ARAUJO & CORTELLI, 2003).

A associação observada por OFFENBACHER *et al.* (1996) entre patologia periodontal e parto pré-termo de bebês de baixo peso não pareceu tão evidente em outras populações (BRUNETTI *et al.* 2004). Todavia, deve-se mencionar que o referido estudo foi um marco de grande valor científico que suportou a condução de novas pesquisas em periodontia. Assim, atualmente os modelos de estudos em medicina periodontal têm incorporado aos dados epidemiológicos clínicos a identificação de biomarcadores associados às relações de risco entre intercorrências gestacionais, doenças cardiovasculares, infecções respiratórias com infecção periodontal.

Validação de biomarcadores e estudos de transição

A contribuição da biologia molecular para a pesquisa de agentes etiológicos, medidas de associação exposição-doença, controle e prevenção de patologias exibe dependência direta do emprego de marcadores biológicos previamente validados em estudos epidemiológicos.

O processo de seleção e validação dos biomarcadores requer cuidados especiais em relação à especificidade e sensibilidade, assim como a medida da exposição e a manifestação dos efeitos observados. A validação representa o processo para estabelecer a relação quantitativa e qualitativa do biomarcador com a exposição (THOMAS, 2004). E, tal validação é efetuada por meio dos chamados estudos de transição os quais analisam a variabilidade intra e inter-indivíduos, otimização de uso, fatores de confusão ou fatores modificadores que afetam o biomarcador, e, finalmente quais os eventos biológicos são

Quadro 1

RESUMO DOS PRINCIPAIS BENEFÍCIOS ASSOCIADOS AO EMPREGO DE BIOMARCADORES EM EPIDEMIOLOGIA.
1. Delineamento seqüencial dos eventos observados desde a exposição até o desenvolvimento da doença.
2. Identificação precoce e em pequena escala de eventos associados à história natural da doença.
3. Maior precisão da classificação das variáveis dependentes e independentes.
4. Indicação de mecanismos pelos quais a exposição se relaciona com uma determinada doença.
5. Melhora na determinação de indivíduos ou grupos de risco.
6. Avaliação mais precisa da variabilidade entre indivíduos e dos critérios de susceptibilidade.

realmente identificados por um determinado marcador biológico.

Para exemplificar o problema da validação, em periodontia foi proposta a utilização de um kit comercialmente disponível para a identificação de Interleucina, o qual posteriormente não se mostrou adequado em relação a sua proposta original (GREENSTEIN & HART, 2002). Em geral a validade de um biomarcador se encontra subordinada a três fatores: 1) extensão na qual o biomarcador representa diretamente o fenômeno biológico subjacente (Ex: interleucina – IL1 β e reabsorção óssea); 2) extensão na qual o biomarcador se relaciona com outras características ou com outros marcadores do mesmo fenômeno biológico subjacente (ex: fator de necrose tumoral – TNF \pm , interleucina e perda de inserção clínica) e 3) extensão na qual o biomarcador atua como preditor do fenômeno biológico subjacente (ex: prostaglandina – PGE₂ e nascimento pré-termo de bebês de baixo peso).

Técnicas utilizadas em estudos de epidemiologia molecular

Sem dúvida o grande marco que revolucionou a biologia molecular foi a descrição por CRICK & WATSON (1953) da natureza de dupla-hélice do DNA e sua produção pelo pareamento de bases. Desde então uma série de técnicas tem sido descrita e aprimorada e, se utilizadas em conjunto com a epidemiologia clássica e com avaliações clínicas apropriadas, tendem a facilitar não apenas o trabalho dos pesquisadores como dos próprios clínicos. Técnicas como PCR (reação em cadeia da polimerase), PCR em tempo real, hibridização com sondas de DNA, *Checkerboard DNA – DNA hybridization*, e seqüenciamento de DNA têm sido empregadas em epidemiologia molecular. Em geral, estas exibem reprodutibilidade excelente

(similaridade de resultados, por exemplo, quando da repetição da análise de uma mesma amostra) e resultados confiáveis para cada amostra pesquisada comparativamente a técnicas mais tradicionais como sorotipagem.

Ao contrário dos pesquisadores, deve-se lembrar que os clínicos têm maior interesse em questões individuais, podendo os métodos epidemiológicos moleculares auxiliarem na elaboração de respostas para as seguintes questões:

1. O tratamento oferecido eliminou ou controlou a doença? (ex: redução na produção de citocinas)
2. Existe um foco de infecção à distância? (ex: medicina periodontal); ou foco persistente? (ex: sítio periodontal refratário)
3. Existe recidiva da doença? (ex: nova produção de citocinas ou recolonização por patógenos periodontais)
4. O agente infectante apresenta ou desenvolveu resistência a drogas antimicrobianas? (ex: identificação de genes de resistência bacteriana)

Engenharia genética

A manipulação laboratorial dos processos biológicos de plantas, animais e microrganismos foi, até a incorporação das técnicas moleculares denominadas de biotecnologia, a qual tem sido empregada na indústria alimentícia, por exemplo, para o feitiço de pão e cerveja. A partir de tal incorporação, que se deu em meados do ano 1970 (MURRAY, 1980), a biotecnologia passou a ser chamada de engenharia genética. A manipulação de genes e a criação de diferentes combinações genéticas, por exemplo, pelas técnicas de clonagem, possibilita a elaboração de materiais que naturalmente são apenas disponíveis em pequenas quantidades como, por exemplo, a produção de interferons para o tratamento de infecções virais e de insulina para o tratamento da diabetes melito. Mas, antes de utilizar as técnicas de recombinação gênica, o código genético teve que ser decifrado por meio desta mesma tecnologia.

Em periodontia, a terapia gênica tem acarretado avanços significativos nas técnicas periodontais reconstrutivas embora ainda não tenha oferecido grandes benefícios para a prevenção das doenças periodontais (KARTHIKEYAN & PRADEEP, 2006). Diferentes sistemas de liberação de genes *in vivo* e *ex vivo* têm sido testados quanto à habilidade de estimular ou inibir moléculas específicas associadas ao metabolismo dos tecidos periodontais (TABATA et al. 2005). No que se refere à engenharia tecidual, progressos já foram alcançados nos sistemas de liberação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas e as proteínas ósseas morfogenéticas (RAMSEIER et al., 2006).

Bancos de DNA

Uma das principais características da genética atual tem sido

a crescente utilização da análise direta do material genético. Para que muitas dessas análises sejam possíveis é necessário que certa quantidade de DNA esteja disponível e, por sua vez, a estocagem das amostras de DNA origina os Bancos de Material Genético ou Bancos de DNA. O DNA isolado de amostras clínicas, assim como tecidos preservados na íntegra incluindo sangue e cordão umbilical, pode representar bancos de DNA. Além do emprego em pesquisa, a análise molecular do material estocado pode ser utilizada com finalidade de diagnóstico incluindo doenças de herança genética ou com caráter de agregação familiar (ex: síndrome de Down e fibromatose gengival hereditária), odontologia legal (ex: como substituto da análise das arcadas dentárias), terapia (ex: transplante de medula óssea) além do tratamento de doenças associadas ao desenvolvimento do indivíduo.

Ainda não se sabe ao certo o efeito que o tempo poderá exercer sobre o material estocado. Para fins de pesquisa epidemiológica que apresente análise microbiológica pela hibridização com sondas de DNA genômico, KATSOULIS *et al.* (2005) sugeriram que as amostras clínicas coletadas em diferentes épocas fossem armazenadas por período equivalente, devido à influência do fator tempo sobre os resultados observados. Estes autores observaram redução nas proporções de *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* e *Campylobacter gracilis* (21,1% para 6,6%) e aumento nas proporções de *Campylobacter rectus* (2,6% para 15,8%), enquanto *Streptococcus spp.*, *Tannerella forsythensis* e *Fusobacterium nucleatum* não foram afetados pelos 12 meses de estocagem. Assim, não se deve comparar os resultados microbiológicos de amostras recém coletadas com aqueles provenientes da análise de amostras congeladas por períodos mais longos de tempo. Apesar de este achado estar no momento mais vinculado à pesquisa epidemiológica, o periodontista deve se manter atento às condições e tempo de armazenamento das amostras periodontais que ele eventualmente envia para análise microbiológica em laboratórios comerciais.

Considerações éticas

A estocagem de material acarreta em obrigações por parte de doadores e órgãos ou instituições mantenedoras. Dados moleculares, principalmente quando envolvem informações genéticas diferem de outras características de saúde, pelo fato de muitas vezes serem indicadores precisos de uma doença ou condição. Além disso, deve-se considerar o envolvimento e possível exposição de outros membros de uma mesma família. Por isso, a epidemiologia molecular tende a exibir problemas éticos incomuns a pesquisa periodontal tradicional. Em termos específicos o próprio Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, embora de forma não intencional, pode não ter seus princípios

totalmente respeitados uma vez que por concepção o indivíduo concede sua participação ou seu material de modo consciente e para um fim específico. Um estudo realizado na França com 170 indivíduos pode ilustrar bem o que ocorre. Foram aplicados questionários com a finalidade de averiguar os efeitos da informação fornecida pelo clínico sobre os indivíduos com DNA estocado. Os resultados foram muito surpreendentes, sobretudo, ao considerarmos o nível sócio-cultural do país, visto que 1/3 dos participantes responderam ao questionário, dos quais apenas 20% absorveram entendimento suficiente sobre os objetivos de um teste genético. E, nenhum indivíduo relatou estar ciente sobre a estocagem de seu material nem ao menos recordaram ter assinado o TCLE (MOUDEL et al., 2001).

Agora vamos hipotetizar a seguinte situação, um indivíduo submetido a uma exodontia concedeu uma biópsia de tecido ósseo para pesquisa de citocinas. Podemos então questionar, mas, e se no futuro o desenvolvimento de novas técnicas regenerativas requeressem uma análise molecular de componentes celulares? Este material poderia ser utilizado? A resposta é não. Mas, e se o doador fosse localizado e aceitasse esta nova aplicação? A resposta se tornaria então afirmativa. Mas, e se o indivíduo estivesse morto e seu filho acidentado é que precisasse de um enxerto ósseo elaborado a partir do banco de DNA? A família teria autonomia sobre o tecido doado e estocado por anos?

Muito provavelmente questões como estas refletem uma nova realidade na pesquisa médico-odontológica e não muito distante da periodontia clínica.

Impacto sobre a interação microrganismos e hospedeiro

A doença periodontal é uma infecção que surge da interação entre microbiota e resposta de um indivíduo susceptível, a qual é modulada por fatores de risco ambientais, locais e sistêmicos (NUNN, 2003). Como agora está claro que é impossível desvincular a epidemiologia da pesquisa periodontal, nesta etapa da revisão é possível fazer uma alusão sobre os benefícios que a biologia molecular trouxe à epidemiologia periodontal. Em termos microbiológicos, foram estabelecidas as espécies e as proporções bacterianas associadas com saúde e doença periodontal (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994; XIMENEZ-FYVIE et al. 2000; CORTELLI et al. 2005³), foi promovida a identificação de novas espécies ainda não cultivadas (KUMAR et al. 2003), caracterização da microbiota da língua (KAZOR et al. 2003) bem como o seqüenciamento do genoma de microrganismos considerados patógenos periodontais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anteriormente *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) e *Porphyromonas gingivalis*.

Embora o papel de alguns vírus na etiologia e/ou patogênese

da doença periodontal tenha sido suposto há cerca de cinco décadas apenas a aplicação de técnicas moleculares (PCR) permitiu a detecção de vírus específicos (SLOTS, 2005; IMANISHI, 2005). Além disso, inúmeros patógenos somente expressam genes de virulência quando colonizam ou infectam o hospedeiro e, os métodos tradicionais não possibilitavam a análise de tais fatores (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 2005). Adicionalmente, as técnicas moleculares (*checkerboard DNA – DNA hybridization*) possibilitaram uma análise panorâmica das relações ecológicas que ocorrem *in vivo* no ambiente bucal e periodontal.

A aplicação de técnicas moleculares também possibilitou estabelecer se dois ou mais indivíduos (ex: estudos de transmissão mãe-filhos) ou se dois ou mais sítios periodontais são colonizados exatamente pela mesma cepa microbiana (CORTELLI et al. 2005b).

Impacto sobre a classificação das doenças periodontais

Os sistemas classificatórios de doença periodontal encontrados ao longo do tempo têm sido influenciados pelos paradigmas que refletem o conhecimento disponível em uma determinada época. E, por isso, tais sistemas não podem ficar estagnados. Ao contrário, devem exibir uma dinâmica de revisões sistemáticas. A busca pela etiologia das doenças periodontais se iniciou nos “Anos Dourados” da bacteriologia médica – 1880 a 1920 – época na qual os agentes etiológicos de muitas patologias infecciosas foram isolados e caracterizados. Entretanto, este conceito permaneceu obscuro por um longo período no qual os microrganismos foram considerados apenas agentes secundários de doença. De meados dos anos 20 até o início dos anos 60, defeitos constitucionais, trauma oclusal e erupção passiva foram considerados agentes causais de doença periodontal. Ao lado da não efetividade da terapia suportada por estas teorias, estudos epidemiológicos em modelos animais e em seres humanos trouxeram novamente à tona o conceito de etiologia microbiana. Passada a era da “hipótese da placa inespecífica”, e, acreditando-se na “teoria da placa específica”, os resultados advindos de outros estudos epidemiológicos começaram a apontar para diferenças populacionais (FERES et al. 2004).

Mas, foi no fim da década de 80 e início da década de 90 que o aprimoramento técnico possibilitou um entendimento mais profundo sobre os mecanismos de patogênese das doenças periodontais. Embora as classificações de 1989 (AAP, 1989) e 1999 (ARMITAGE, 1999) tenham sido suportadas pela combinação de diversas características, segundo ARMITAGE (2002) apenas o conhecimento aprimorado de características microbiológicas e genéticas do hospedeiro decorrentes de técnicas moleculares suportará uma classificação realmente

baseada em etiologia. E esse autor apontou como desafios para as futuras revisões estabelecer quais os aspectos que podem ser responsabilizados pela diversidade de expressões clínicas das patologias periodontais.

Impacto sobre o diagnóstico periodontal

Dos três aspectos anteriormente apontados como necessários para validar um biomarcador, sem dúvidas, o mais importante é o valor preditivo, ou seja, o quanto o biomarcador prevê a ocorrência do fenômeno biológico. E é exatamente a previsibilidade o aspecto mais almejado em termos de diagnóstico periodontal, pois, apenas esta é capaz de assegurar ao biomarcador um caráter preventivo. Embora a perda de inserção clínica mensurada por sondagem manual seja adequada para avaliar a progressão da doença periodontal, ela avalia apenas o dano ocorrido e não distingue um quadro atual de uma história passada de doença periodontal.

Em periodontia, mediadores inflamatórios do fluido sulcular, citocinas (NARES, 2003), marcadores genéticos (NARES, 2003), e microrganismos (EZZO & CUTLER, 2003) têm sido apontados como possíveis preditores de doença. No futuro, os métodos de diagnóstico irão identificar os indivíduos com risco aumentado para doença periodontal possibilitando ao periodontista uma atuação no estágio da prevenção primária.

Impacto sobre a terapia periodontal

O tratamento das doenças periodontais cujo foco são os microrganismos periodontopatogênicos e/ou fatores de virulência associados parece apresentar alta seletividade, todavia a supressão microbiana pode muitas vezes ser um objetivo distante. Assim, os achados provenientes da epidemiologia molecular podem contribuir para novas propostas terapêuticas voltadas para os mecanismos patológicos dependentes do hospedeiro. Estas novas estratégias terapêuticas podem incluir o aumento na disponibilidade bucal de peptídeos com ação antimicrobiana (OUHARA *et al.* 2005), tanto pelo estímulo à síntese celular como pela administração de peptídeos sintéticos. Além desta, a regulação e controle de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, pela utilização de bloqueadores dos canais de potássio (VALVERDE *et al.* 2005), e, inibição das proteinases teciduais, como por exemplo, matriz metaloproteinase (RAMAMURTHY *et al.* 2005) também parece demonstrar efeitos benéficos no controle da inflamação gengival e reabsorção óssea alveolar.

A terapia gênica poderá exercer ainda um efeito favorável no tratamento regenerativo das lesões que por falta de diagnóstico precoce não puderam ser prevenidas ou controladas. Por exemplo, o gene da fibromatose gengival hereditária identificado em 2002 (HART *et al.*, 2002) pode ser manipulado para que, no futuro, as papilas gengivais possam

ser adequadamente reconstruídas. E, quem sabe no futuro a aplicação de vacinas no controle (HARDHAM *et al.* 2005) e prevenção da doença periodontal humana também possam se tornar uma realidade.

CONCLUSÕES

A viabilidade e aplicabilidade de estudos epidemiológicos incorporando dados de biologia molecular, ainda são desafiantes porque dependem de técnicas que muitas vezes não permitem a inclusão de um número grande de indivíduos, o que torna complicado inferir resultados a partir dos dados observados. Entretanto, torna-se clara a necessidade de sua inclusão na pesquisa periodontal atual, pois os achados em epidemiologia se tornam mais consistentes quando se repetem em outros estudos conduzidos em diferentes grupos populacionais.

Para melhorar a nossa habilidade em tomar decisões apropriadas, torna-se necessária a utilização de amplos instrumentos metodológicos que possam contribuir para a validação das pesquisas científicas. Neste contexto a epidemiologia molecular pode ser uma importante ferramenta no controle dos vieses associados aos tradicionais desenhos de estudo. Sua contribuição pode tornar a pesquisa epidemiológica um instrumento mais apurado e, conseqüentemente, fornecer dados imprescindíveis na formação de uma base racional consistente para as investigações clínicas. Assim, programas de prevenção mais efetivos poderiam ser planejados e implementados, contribuindo para o controle e tratamento das doenças e, amenizar o sofrimento humano associado a elas.

Agradecimentos

À CAPES pela bolsa de mestrado.

ABSTRACT

Epidemiology is a fundamental science for clinical investigation; therefore, it is crucial for the development of meaningful studies on the natural history of a disease, on the quality of diagnostic methods, evaluation of risks and of clinical interventions effectiveness. Great development in epidemiological outlining has been observed in the last years in the field of periodontology. Thus, in this context of development the molecular epidemiology is applied, where by monitoring biological markers a more detail understanding of the biological events involved in the pathogenesis of the diseases is allowed. Techniques as PCR, real time PCR and DNA probes have been applied in Molecular Epidemiology clarifying questions and exerting a strong impact over different aspects of periodontology.

Molecular Epidemiology actually changes the view dominated by more simplistic theories into more elaborate patterns of the diseases that associate host, environmental and causal factors. Naturally the view of what Molecular Epidemiology represents can differ greatly; however, we can attribute specific benefits to Molecular Epidemiology mainly the identification of early events associated with natural history of disease or the more precise identification of individuals or risk groups. After the analyses of

the studies it can be concluded that the Molecular Epidemiology seems to be an important tool in the control of bias associated with traditional study patterns. Its contribution can make epidemiologic studies a more accurate tool, and offer vital data to create consistent rational basis for clinical investigation.

UNITERMS: epidemiologic studies, molecular diagnostic techniques, biological markers, periodontics.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- American Academy of Periodontology. Princeton, New Jersey. July 23-27. Proceedings of the workshop in clinical periodontics. Chicago, 1989.
- 2- Armitage GC Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4:1-6.
- 3- Armitage GC. Classifying periodontal diseases - a long-standing dilemma. *Periodontology* 2000 2002; 30: 9 - 23.
- 4- Baelum V, Lopez R. Periodontal epidemiology: towards social science or molecular biology? *Commun Dent Oral Epidemiol* 2004; 32: 239 - 249.
- 5- Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan SF, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 860 - 866. (b).
- 6- Cortelli SC, Feres M, Rodrigues AAB, Aquino DR, Shibli JA, Cortelli JR. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 2005; 76: 204-209. (c).
- 7- Boffetta P. Molecular epidemiology. *J Int Medicine* 2000; 248: 447 - 454.
- 8- Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol* 2000 2003; 32: 24 - 35.
- 9- Fenollar F, Raoult D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *Apmis* 2004; 112: 785 - 807.
- 10- Feres M, Cortelli SC, Figueiredo LC, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological basis for periodontal therapy. *J Appl Oral Sci* 2004; 12: 256 - 266.
- 11- Forattini, OP. *Ecologia, epidemiologia e sociedade*. 2ed. São Paulo: Artes Médicas, 2004.
- 12- Gordis L. *Epidemiology*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000.
- 13- Greenstein G, Hart TC. A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002; 73:231-47.
- 14- Hart TC, Zhang Y, Gorry MC, Hart PS, Cooper M, Marazita ML, Marks JM, Cortelli JR, Pallos D. A mutation in the *SOS1* gene causes hereditary gingival fibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 943 - 954.
- 15- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 78-111.
- 16- Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol* 2000 2005; 38: 9 -12.
- 17- Hardham J, Reed M, Wong J, King K, Laurinat B, Sfintescu C, Evans RT. Evaluation of a monovalent companion animal periodontal disease vaccine in an experimental mouse periodontitis model. *Vaccine* 2005; 23: 3148 - 3156.
- 18- Karthikeyan BV, Pradeep AR. Gene therapy in periodontics: a review

- and future implications. *J Contemp Dent Pract* 2006; 7: 83 - 91.
- 19- Katsoulis J, Heitz-Mayfield LJR, Weibel M, Hirschi R, Lang NP, Persson GR. Impact of sample storage on detection of periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 128 - 130.
- 20- Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 558-563.
- 21- Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moewschberger ML. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003; 82: 338 - 344.
- 22- Murray K. Genetic engineering: possibilities and prospects for its application in industrial microbiology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 290: 369 - 386.
- 23- Moutel G, de Montgolfier S, Meningaud JP, Herve C. Bio-libraries and DNA storage: assessment of patient perception of information. *Med Law* 2001; 20: 193 - 204.
- 24- Nares S. The genetic relationship to periodontal disease. *Periodontol* 2000 2003; 32: 36 - 49.
- 25- National Research Council. Biological markers in environmental health research. *Environ Health Perspect* 1987; 74: 1 - 191.
- 26- Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol* 1996; 67: 1103 - 1113.
- 27- Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H, Sugai M. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta} - defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 888 - 896.
- 28- Ramamurthy NS, Greenwald RA, Celiker MY, Shi EY. Experimental arthritis in rats induces biomarkers of periodontitis which are ameliorated by gene therapy with tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Periodontol* 2005; 76: 229 - 233.
- 29- Ramseier CA, Abramson ZR, Jin Q, Giannobile WV. Gene therapeutics for periodontal regenerative medicine. *Den Clin North Am* 2006; 50: 245 - 263.
- 30- Schulte PA, Perera FP. *Molecular epidemiology: principles and practices*. San Diego: Academic Press, 1993.
- 31- Slots J. Herpesvirus in periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2005; 38: 33 - 62.
- 32- Taba M Jr, Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res* 2005; 8: 292 - 302.
- 33- Thomas DC. *Statistical methods in genetic epidemiology*. New York: Oxford University Press, 2004.
- 34- Valverde P, Kawai T, Taubman MA. Potassium channel-blockers as therapeutic agents to interfere with bone resorption of periodontal disease. *J Dent Res* 2005; 84: 488 - 499.
- 35- Waerhaug J. Prevalence of periodontal disease in Ceylon. Association with age, sex, oral hygiene, socio-economic factors, vitamin deficiencies, malnutrition, betel and tobacco consumption and ethnic group. Final report. *Acta Odontol Scand* 1967; 25: 205 - 231.
- 36- Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra and subgingival plaque in health and periodontitis. *J. Clin Periodontol.* 2000; 27: 648-657.

Endereço para correspondência:
Sheila Cavalca Cortelli
Rua Expedicionário Ernesto Pereira, 110 - Centro
CEP: 12020-330 - Taubaté - SP
Tel.: (12) 3625-4147
E-mail: cavalcacortelli@uol.com.br