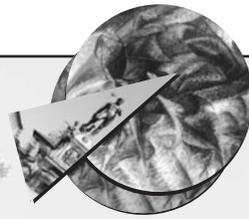


SIdP



POLIMORFISMI DI GSTM1/GSTT1-NULL IN PAZIENTI CAUCASICI: ASSOCIAZIONE CON LA PARODONTITE CRONICA E AGGRESSIVA

Caterina D'Autilia^{1*}, Claudio Arcuri², Francesco Cecchetti², Giorgio Deli¹

1) Institute of Dentistry - Catholic University of Rome, Italy

2) U.O.C. of Dentistry, "S. Giovanni Calibita" General Hospital, Fatebenefratelli/AFAR Institute of Periodontology "Torvergata" University, Rome, Italy.

Atti della Sessione di ricerca Premio "HM Goldman" - XV Congresso Nazionale SIdP - Bologna 6-7-8 Marzo 2008

RIASSUNTO

Un campione di pazienti parodontali di etnia Caucasica, sono stati studiati con tecniche di PCR allele-specifica per indagare la prevalenza dei polimorfismi di GSTT1 e GSTM1. La variante GSTM1-null risulta associata sia con la forma cronica che con la forma aggressiva di parodontite, mentre GSTM1 + GSTT1-null con la parodontite aggressiva.

SUMMARY

A group of Caucasian periodontal patients were studied for their Glutathione-S Transferase T1(GSTT1) and/or Glutathione-S Transferase M1 (GSTM1) polymorphisms by allelic specific PCR techniques. The GSTM1-null variant seems to be associated with the two forms of periodontities, while the aggressive one needs also a second GSTT1-null variant.

INTRODUZIONE

Sebbene la causa diretta delle parodontiti sia l'infezione batterica, la loro progressione dipende da fattori genetici ed ambientali (Brett PM et al. 2005) [1]. Lo stesso fumo, che è un reale fattore di rischio ambientale, determinerebbe i pattern individuali di sviluppo e di severità della malattia parodontale, sotto condizionamento genetico (Kim J-S, Park JY, 2004 [2], Kocher T et al. 2002 [9]). Nello specifico, la combustione del tabacco produce alcune sostanze che sono attivate metabolicamente dagli enzimi di Fase I collegati al Citocromo P-450, mentre vengono detossificate attraverso la coniugazione con vari enzimi di fase II (epossido idrolasi, glutathione s- transferasi, N-acetiltransferasi e sulfotransferasi, etc) (Zeng et al. 2001 [3]). L'equilibrio tra espressione e regolazione di queste sostanze sarebbe importante nel determinare o meno la suscettibilità a varie patologie. In particolare, gli enzimi delle classi μ [Glutathione-S Transferasi M1(GSTM1)] e

τ [Glutathione-S Transferasi T1(GSTT1)], coinvolti nella detossificazione degli idrocarburi aromatici policiclici (come gli epossidi ed i metaboliti idrossilati del benzo-pirene), presenti nel fumo di sigaretta, sembrano essere coinvolti nei processi di detossificazione delle prime vie del tratto aerodigestivo (*Ketterer et al 1992*) [4], nei processi infiammatori cellulari e nelle patologie da invecchiamento o in quelle degenerative (*BOLT HM et al. 2006*) [5]. Il *locus* del gene GSTM1 è localizzato sul cromosoma 1p13.3. Sono state identificate tre varianti dello stesso *locus*: due alleli (GSTM1a e GSTM1b), che differiscono per la sostituzione di C con G nella posizione base 534, e la delezione del gene (polimorfismo-*null*). Quest'ultima condizione è caratterizzata dall'assenza di specifica attività enzimatica con la conseguente ridotta capacità di detossificare sostanze potenzialmente tossiche fra cui quelle prodotte dal fumo. Il gene GSTT1 è localizzato sul cromosoma 22q11.2; il genotipo omozigote per l'allele *null* è stato definito come GSTT1-0, mentre il genotipo con almeno uno degli alleli funzionanti è stato denominato GSTT1-1. La inattività funzionale degli enzimi detossificanti determina, inevitabilmente, un aumento del danno tissutale ad opera delle sostanze ossidanti soprattutto nei soggetti fumatori. Per questa ragione l'associazione tra GSTM1 e parodontite è stata studiata da *Kim nel 2004* [2]. Detto lavoro riporta un aumentato rischio di sviluppare la parodontite in individui Koreani portatori della variante GSTM1-*null*, però non distingue fra forma cronica ed aggressiva di parodontite, come ammesso dagli stessi autori. Inoltre, le varianti di GSTT1 non sono state studiate.

Lo scopo del presente studio è quello di analizzare la prevalenza delle varianti GSTM1 e GSTT1 nelle forme aggressive e croniche di parodontite osservate in un gruppo di pazienti Caucasici arruolati nel centro Italia.

MATERIALI E METODI

Pazienti: per lo studio sono stati arruolati 119 pazienti consecutivi, giunti ai dipartimenti di Parodontologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore e dell'ospedale Fatebenefratelli, in Roma, per una prima visita parodontale, tra gennaio e dicembre 2007. I criteri di inclusione sono stati i seguenti: diagnosi di parodontite cronica o aggressiva, nessuna terapia parodontale (causale e/o chirurgica) eseguita nei 6 mesi precedenti, nessuna patologia sistemica (i pazienti con diabete, malattie di immunodeficienza primaria, deficit dei neutrofili o neutropenia ciclica sono stati esclusi dallo studio). Le diagnosi parodontali sono state effettuate in accordo con *Armitage, 1999* [6] e *Tonetti & Claffey 2005* [7]. Tutti i pazienti con diagnosi incerta (per esempio, con fattori ritentivi di placca e/o indici di placca troppo elevati se commisurati al danno parodontale presente) sono stati esclusi dallo studio.

I nostri criteri diagnostici hanno preso in considerazione solo l'evidenza dei dati clinici. Un unico odontoiatra esperto, in ciascuna delle due strutture sanitarie, ha sottoposto tutti i pazienti ad un attento esame obiettivo orale, in accordo con le linee guida dettate dalla Società Italiana di Parodontologia (SIdP) e ad una approfondita anamnesi. Su una scheda parodontale sono stati annotati: profondità di sondaggio, recessioni, livello di attacco clinico (CAL), BOP, indici parodontali, mobilità dentale ed i segni di infiammazione al fine di identificare la severità e l'estensione della patologia a TO. Per ciascun paziente è stato eseguito un appro-

priato esame radiologico endorale per diagnosticare presenza di riassorbimento osseo (verticale e/o orizzontale). Sono stati pertanto distinti: **92** pazienti con parodontite cronica e **27** pazienti con parodontite aggressiva. Inoltre, è stato fatto compilare un questionario che, fra le altre, richiedeva le seguenti informazioni: identificazione, etnia, età, sesso, altezza, peso, grado di istruzione, patologie sistemiche, abitudini di igiene orale (numero dei lavaggi dei denti al giorno), abitudini relative al fumo (valutato come fumo sì/no, numero di sigarette al giorno, numero di anni di fumo) (*Albandar JM et AL. 2000*) [8].

Controlli: **71** soggetti, sani dal punto di vista sistemico, che non mostravano perdita di attacco prossimale (profondità di sondaggio ≤ 4 mm), con FMBS (full mouth bleeding score) $< 20\%$, né difetti ossei riscontrabili radiograficamente e con un FMPS (full mouth plaque score) $< 30\%$ sono stati arruolati nello studio come controlli sani. Anche i controlli hanno compilato lo stesso questionario dei pazienti e sono stati esaminati con la medesima accuratezza.

Estrazione del DNA

Il DNA genomico è stato estratto da campioni di 5 ml di sangue prelevato in provette e stoccato a -20°C fino al momento della processazione. Il DNA estratto è stato processato con l'ausilio del kit High Pure PCR Template Preparation (ROCHE Diagnostic, GmbH, Mannheim, Germany). I campioni di DNA estratto sono stati quantificati con l'ausilio di uno spettrofotometro a 260 nm e conservati a -20°C .

Controlli di qualità: gruppi di 10-20 campioni dal gruppo controllo e dai pazienti con parodontite sono stati saggiati nel medesimo set analitico. A ciascun set, sono stati saggiati in duplicato almeno 2 campioni dei pazienti e due dei controlli, con risultati sovrapponibili. Controlli di acqua sono stati estratti e saggiati in duplicato dando amplificazioni negative. Per escludere contaminazioni crociate, tutte le procedure sono state eseguite in tre stanze indipendenti e separate, assicurando che la specifica qualità dei controlli fosse accuratamente garantita.

Analisi dei polimorfismi di GSTM1 e GSTT1

La PCR allele-specifica è stata effettuata su 100 ng di DNA genomico. In particolare, la miscela di reazione multiplex consisteva in 50 μl contenenti 30 picomoli dei seguenti primers: GSTM1 (forward 5'- GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3'; e reverse: 5'- GTT GGG CTC CAA ATA TAC GGT GG-3' e GSTT1 (forward: 5'- TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3'; e reverse: 5'- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3').

Come controllo interno e' stato amplificato anche il gene dell'albumina (forward: 5'- GCC CTC TGC TAA CAA GTC CTA C-3'; e reverse: 5'- GCC CTA AAA AGA AAA TCG CCA ATC - 3').

La miscela di reazione consisteva in 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM dNTPs, 5 μl 10x PCR Buffer (10x 500 mM KCL, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0), e 2U Taq DNA polymerase (Promega Italia, S.r.l, Milano, Italy).

Dopo la denaturazione iniziale a 95°C per 2 minuti, i campioni erano sottoposti a 30 cicli con il seguente protocollo di PCR: 1 minuto a 94°C per la denaturazione, 1 minuto a 64°C per l'accoppiamento delle basi, 1 minuto a 72°C per l'allungamento del DNA, 7 minuti di estensione finale a 72°C terminavano il processo. La efficienza di reazione della PCR è stata controllata in elettroforesi al 2% di gel di agarosio.

I genotipi sono stati definiti sulla base delle differenti bande elettroforetiche come precedentemente descritto in letteratura. I numeri di referenza per ciascun *locus* GST sono rispettivamente: MIM 138350 per GSTM1 e MIM 600436 per GSTT1.

Infine, il laboratorio ha effettuato i test senza essere informato della diagnosi dei pazienti fino al momento della analisi definitiva dei risultati. Sia i pazienti che i controlli erano identificati tramite numeri progressivi.

Analisi statistica: è stato utilizzato un test X^2 per confrontare dati categorici, mentre è stato utilizzato il test del t di Student per confronti quantitativi. La significatività è stata definita tale per $P \leq 0.05$. Tabelle di contingenza sono state utilizzate per valutare le interazioni tra le varianti GSTT1 e GSTM1. Un'analisi multivariata di regressione logistica è stata applicata al fine di correggere possibili interferenze da differenze di fumo, età, igiene, sesso, BMI e grado di istruzione. I dati sono stati processati applicando un'analisi "stepwise" di regressione logistica ottenuta con specifico programma SPSS (SPSS 12.0, Chicago, Illinois USA). Equilibrio Hardy-Weinberg: questo dato non può essere calcolato quando i soggetti eterozigoti non possono essere identificati (come nel nostro caso).

RISULTATI

Le caratteristiche dei pazienti sono schematizzate nella Tabella 1.

La Tabella 2 mostra la prevalenza delle varianti di GSTM1 oppure di GSTT1 stratificate per pazienti e controlli. Riguardo alla prevalenza di GSTM1 e GSTT1 in particolare è stata riscontrata una associazione fra entrambe le forme di parodontite esaminate (cronica e aggressiva) *versus* GSTM1. Sono inoltre riportate tutte e quattro le combinazioni fra i polimorfismi di GSTM1 e GSTT1. L'ultima colonna della tabella valuta la distribuzione del genotipo doppio null/null *versus* tutti gli altri. Nella Tabella 3a viene eseguita un'analisi univariata di confronto tra gruppi. Infatti viene analizzata la significatività dell'associazione tra GSTM1 o GSTT1 o di entrambe le parodontiti (cronica ed aggressiva), nel confronto con i controlli. GSTM1-*null* e' statisticamente associata sia alla parodontite cronica che a quella aggressiva. L'osservazione dei dati riguardanti GSTT1-*null* mostra che, singolarmente, la variante *null* di questo gene sembra non essere coinvolta in entrambe le forme di parodontite, anche se comunque una lieve differenza di frequenza fra le due forme cronica ed aggressiva esiste.

Le parodontiti aggressive sembrano significativamente associate con la combinazione *doppio null GSTM1+GSTT1*.

Nella Tabella 3b viene effettuata un'analisi di regressione logistica multivariata di confronto fra i gruppi. Da questa, dopo aver corretto per età, sesso, fumo ed abitudini igieniche orali si conferma una significativa associazione fra GSTM1 ed entrambe le forme di parodontite, come pure fra il doppio genotipo *null* e la forma aggressiva.

DISCUSSIONE

I dati presentati, nell'ambito di questo studio, mostrano un'associazione statisticamente rilevante della variante GSTM1-*null* sia con la parodontite cronica che con quella aggressiva. Inoltre la forma aggressiva è risultata significativamente associata con la combinazione delle varianti doppio GSTM1+GSTT1 *null*. Questo evidenzerebbe che le forme aggressive di parodontite potrebbero essere prevalentemente caratterizzate dalla inattività di entrambi gli enzimi deputati alla detossificazione degli idrocarburi aromatici policiclici. Nella parodontite cronica si osser-

va la variante *null* soprattutto per quanto riguarda GSTM1. Da quanto sopra esposto si sarebbe indotti a ritenere che i soggetti affetti da una forma aggressiva di parodontite siano molto più esposti al danno tissutale, qualora questo sia portato da sostanze che non possono essere adeguatamente metabolizzate da enzimi specifici, sia dal punto di vista quali/quantitativo che da quello temporale. Alcune delle variabili di base che caratterizzano sia i pazienti che i controlli presentano differenze significative: età, fumo e abitudini igieniche orali. Queste variabili potrebbero rappresentare fattori di interferenza nelle associazioni osservate in questo studio. Per ovviare a questo inconveniente, è stata ricalcolata la significatività, dopo analisi di regressione logistica, corretta per le variabili di base prima menzionate.

Tabella 1. Caratteristiche di base dei soggetti studiati

Gruppi	N	Età (anni)		sesso		lavaggi/die	sigarette/die	Fumo		Pacchi medi/anno
		Media	SD	F	M	Media ± SD	Media ± SD	No	SI	Media ± SD
Parodontite cronica	92	51.8	8.3	51	41	1.9 ± 0.7	5.8 ± 9.4	56	36	9.8 ± 18.4
Parodontite aggressiva	27	39.1	11.7	18	9	1.8 ± 0.9	5.6 ± 7.8	16	11	5.4 ± 7.9
Controlli	71	33.9	12.1	42	29	2.2 ± 0.6	1.8 ± 4.3	57	14	2.3 ± 6.7
P=		<0.0000001		0.57		0.006	0.007	0.02		0.01
Confronti										
Croniche vs Aggressive		0.0007		0.41		0.33	0.90	0.99		0.28
Croniche vs Controlli		<0.0000001		0.75		0.01	0.0014	0.02		0.013
Aggressive vs Controlli		0.06		0.65		0.015	0.003	0.06		0.09

MBI, peso, altezza, titolo di studio non sono significativamente differenti fra i gruppi (P>0.10).

Tabella 2. Distribuzione dei pazienti e del numero di controlli (%) in funzione dei polimorfismi di GSTM1 o di GSTT1 o delle loro combinazioni

Gruppi	N	GSTM1		GSTT1		GSTM1 + GSTT1				Doppio NULL	
		Wild	Null	Wild	Null	NU/NU	NU/WI	WI/NU	WI/WI	No	Si
Parodontite cronica	92	27 (29.4%)	65 (70.6%)	68 (73.9%)	24 (26.1%)	11 (12.0%)	54 (58.7%)	13 (14.1%)	14 (15.24%)	81 (88.0%)	11 (12.0%)
Parodontite aggressiva	27	1 (3.7%)	26 (96.3%)	14 (51.9%)	13 (48.1%)	13 (48.2%)	13 (48.2%)	0 (0.0%)	1 (3.6%)	14 (51.9%)	13 (48.1%)
Controlli	71	38 (53.5%)	33 (46.5%)	51 (71.8%)	20 (28.2%)	6 (8.5%)	27 (38.0%)	14 (19.7%)	24 (33.8%)	65 (90.2%)	6 (9.8%)
P =		0.000007		0.08		<0.0000001				0.000004	

Wild = wild type. NU/NU= doppio null per GSTM1 e GSTT1, NU/WI= GSTM1-null e GSTT1-wild type, WI/NU = GSTM1-wild type e GSTT1-null, WI/WI= wild type per entrambi GSTM1 and GSTT1

Tabella 3a. Analisi univariata: significatività nei confronti dei seguenti gruppi

Primo gruppo	Secondo gruppo	GSTM1	GSTT1	Doppio null
		P	P	P
Controlli	Aggressive	0.00002	0.10	<0.00003
Controlli	Croniche	0.003	0.91	0.64
Croniche	Aggressive	0.01	0.05	0.0001

Croniche = parodontiti croniche, aggressive = periodontiti aggressive.

Tabella 3b. Analisi della regressione logistica multivariata. Valori di P calcolati dopo correzione per età, sesso, fumo ed abitudini di igiene dentaria

Primo gruppo	Secondo Gruppo	GSTM1	GSTT1	Doppio null
	P	P	P	
Controlli	Aggressive	0.005	0.060	<0.001
Controlli	Croniche	<0.001	<0.10	>0.10
Croniche	Aggressive	0.07	>0.10	>0.10

La variabile fumo è stata analizzata tre volte come " numero di sigarette al giorno" o "numero di pacchetti fumati di sigarette " o "numero di fumatori e non fumatori". I risultati sono sovrapponibili.

BIBLIOGRAFIA

1. Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, et al. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res* 2005; 84: 1149-53.
2. Kim J-S, Park JY, Choi M-A, Cho K-S, Park K-K. Polymorphisms in gene coding for enzymes metabolizing smoking-derivative substances and the risk of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 959-64.
3. Zheng, Park JY, Guillemette C, Schantz SP, Lazarus P. Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2001; 19: 1411-18.
4. Ketterer B, Harris JM, Talaska G, et al. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect* 1992; 98: 87-94.
5. Bolt HM, Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr Drug Metab* 2006; 7: 613-28.
6. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6.
7. Tonetti MS, Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 210-213.
8. Albandar JM et AL. Cigar, pipe and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol*. 2000 dec; 71(12): 1874-81.
9. Kocher T, Meisel P. Association between bone loss in periodontal disease and polymorphism of N-acetyltransferase (NAT2). *J Clin Periodontol* 2002 Jan; 29(1); 21-7.