

unesp 

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO PROMOTOR DO GENE
***INTERLEUCINA 8* EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA**
PERIODONTAL CRÔNICA.

ARARAQUARA
2008

unesp 

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Yeon Jung Kim

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO
PROMOTOR DO GENE *INTERLEUCINA 8* EM INDIVÍDUOS
COM DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP para a obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientadora:
Prof^ª. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel-Caminaga

ARARAQUARA
2008

YEON JUNG KIM

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO PROMOTOR DO GENE
INTERLEUCINA 8 EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e OrientadorProfª. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga
2º ExaminadorProf. Dr. Sérgio Roberto Line
3º ExaminadorProf Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara, 20 de março de 2008.

Dados Curriculares

YEON JUNG KIM

NASCIMENTO	11 de julho de 1980 –Seul – Coréia do Sul.
FILIAÇÃO	Myoung Hyun Kim Hyun Suk Kim Lee
2000/2003	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.
2004/2005	Estágio de atualização junto à disciplina de Periodontia na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2005/2006	Curso de especialização em Periodontia na Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas - APCD
2006/2007	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Dedicatória

À Deus,

pela sua presença constante na minha vida, forças para seguir sempre em frente nos momentos difíceis, pelo auxílio nas minhas escolhas e pelos sonhos que me permitiu realizar

Aos meus amados pais, **Myoung Hyun Kim e Hyun Suk Kim,**
pelo amor incondicional, apoio, compreensão e pelos exemplos, que me fizeram fortes para que pudesse vencer todos os obstáculos desta caminhada.

Agradecimentos especiais

Aos meus queridos irmãos, **Young Rae** e **Young Hyo** pelo apoio, carinho e incentivo para esta conquista.

Aos meus avôs, pelo apoio, confiança, dedicação e exemplos de vida e amores incondicionais.

Aos meus familiares, pelo carinho e apoio prestados em todos os momentos da minha vida. Mesmo com a distância, vocês estiveram presentes em todas as minhas conquistas.

*“Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver,
Apesar de todos os desafios, compreensões e períodos de crise...*

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo...

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas da sua Diretora, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, e vice-diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla que me acolhe desde 2000.

À minha orientadora Profa. Dra. **Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga**, pelos ensinamentos, confiança em meu trabalho, disponibilidade e a contribuição durante a realização do curso de mestrado.

À amiga **Aline**, que participou desde início deste trabalho, exemplo de amiga e profissional, por todos os momentos desta longa jornada com muita dedicação, confiança e acima de tudo pela grande amizade. Vencemos essa etapa de nossas vidas!

Às amigas especiais da turma 75 **Alessandra, Paty e Leda**, que mesmo distantes nunca deixaram de me apoiar, pelos momentos tão felizes da minha vida.

À minha querida amiga **Andreza**, pelo carinho, amizade, incentivo, pelos momentos de convívio tão importantes.

Aos meus amigos especiais, **Bia, Fer Bello, Fer Lessa, Lícia, Marcia, Lali, Carol, Fábio, Rafael e Romeu**, pela amizade sincera, pelo convívio agradável e por momentos de descontração.

Aos grandes amigos que me apoiaram durante todo esse tempo: **Elaine, Carina, Juliê, Ana Elisa e Lílian**, pela grande amizade e solidariedade prestada durante esses anos.

A Prof. Dra. **Andréa Gonçalves**, pelo início de tudo, pelo apoio e além de tudo pela amizade tão especial.

Ao amigo Prof Dr. **Francisco Guedes**, pela amizade, conselhos e incentivos nos momentos importantes da minha vida, e pelos momentos de convívio tão agradáveis.

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, Prof. Dr. **Benedicto Egbert Corrêa de Toledo**, Prof. Dr. **Ricardo Samih Georges Abi Rached**, Prof. Dr. **Elcio Marcantonio Junior**, Prof. Dr. **José Eduardo Cezar Sampaio**, Profa. Dra **Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior**, que colaboraram com a minha formação de tão variadas formas e em especial aos Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli** e Profa. Dra. **Silvana**

Regina Perez Orrico, pelos auxílios prestados durante a realização desta pesquisa.

A todos os meus colegas de curso de mestrado, **Aline, Naná, Romeu, Rubão, Roberta, Sabrina, Andrés, Wagner, Rodrigo e Marina**, pela troca de conhecimentos e convívio agradável

Aos amigos da turma de pós-graduação: **Vanessa, Ana Emília, Rafa Faeda, Débora, Ju Rico, Bia, Dani Zandim, Alliny, Rafa Sartori, Ishi**, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do laboratório de genética molecular, especialmente **Karen e Rivelto**, que participaram ativamente deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Maurício Meirelles Nagle**, aos **funcionários da disciplina de Clínica Integrada e da Triagem** pela atenção e disponibilidade durante a realização desta pesquisa.

À **Regina Lúcia** pela paciência, cooperação e empenho para que tudo seja da forma mais organizada possível.

Aos **funcionários da disciplina de Periodontia**, e do **departamento de Morfologia**, pela disponibilidade e compreensão que possibilitaram a realização desse trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação **Mara, Rosângela, Flávia e Alexandre**, pela atenção e disponibilidade.

Aos **funcionários da Biblioteca**, por toda atenção e auxílios prestados.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp**, pelo auxílio financeiro concedido para a realização desta pesquisa.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 PROPOSIÇÃO.....	21
3 MATERIAL E MÉTODO.....	23
3.1 Cálculo da amostra.....	24
3.2 Seleção da amostra.....	24
3.3 Coleta do material biológico.....	26
3.4 Extração e quantificação do DNA.....	26
3.5 Análises dos polimorfismos genéticos.....	26
3.5.1 Polimorfismos - 845 T/C e - 738 T/A.....	27
3.5.2 Polimorfismo -353 A/T.....	28
3.6 Análise estatística.....	33
4 CAPÍTULOS.....	34
4.1 Capítulo 1.....	35
4.2 Capítulo 2.....	56
4.3 Capítulo 3.....	76
5 DISCUSSÃO.....	101
6 CONCLUSÃO.....	108
7 REFERÊNCIAS.....	110
8 ANEXOS.....	122

Resumo

Kim YJ. Investigação de polimorfismos no promotor do gene *interleucina 8* em indivíduos com periodontite [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

O estudo investigou se há associação individual dos polimorfismos -353(A/T), -738(T/A) e -845(T/C) na região promotora do gene interleucina 8 (*IL8*), bem como de seus haplótipos, com suscetibilidade à periodontite em indivíduos Brasileiros. Foram selecionados 500 indivíduos de ambos os gêneros (Grupo Controle n=224 e Grupo Periodontite n=276) que procuraram atendimento na Faculdade de Odontologia de Araraquara. A partir do DNA obtido de células da mucosa oral, os polimorfismos -738(T/A) e -845(T/C) foram analisados por *PCR-RFLP* (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*), e o -353(A/T) por *SSP-PCR* (*Sequence Specific Primer – PCR*). Os fragmentos obtidos foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 10%. Para analisar a frequência dos genótipos e alelos foi utilizado o teste χ^2 , ou o programa CLUMP para os polimorfismos que mostraram alelos raros. Os haplótipos foram estimados pelo programa ARLEQUIN e a diferença na distribuição deles entre os grupos foi investigada por meio do programa CLUMP. Os resultados da análise individual dos polimorfismos não evidenciaram associação com a periodontite. Em relação aos haplótipos, as frequências dos mesmos como alelos e/ou genótipos entre Grupo Controle e

Grupo Periodontite apresentaram diferenças estatisticamente significantes considerando a população total e também a não fumante. Os indivíduos com o haplótipo CTA apresentaram-se 2,14 vezes mais susceptíveis à doença periodontal ($p=0,0012$, $OR=2,14$; 95% CI =1,6-3,38). Concluiu-se que houve associação dos haplótipos formados pelos polimorfismos -845(T/C), -738(T/A) e -353(A/T) no gene *IL8* com a suscetibilidade a periodontite na população brasileira estudada.

Palavras-chave: Polimorfismo genético; periodontite; interleucina-8; haplótipos.

Abstract

Kim YJ. Investigation of polymorphisms in the promoter region of *interleukin 8* in Brazilian individuals with periodontitis [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

The purpose of this study was to investigate whether there is an individual association of the -845(T/C), -738(T/A) and -353(A/T) single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *IL8* gene, as well as their haplotypes with susceptibility to periodontitis in Brazilian population. DNA was extracted from buccal epithelial cells from 500 Brazilian individuals (Control group n = 224, Periodontitis group n = 276). The -845 and -738 SNPs were genotyped by PCR-RFLP method (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism). The -353 SNP was investigated using the Sequence Specific Primers Polymerase Chain Reaction method (SSP-PCR). Differences of the allelic and genotypic frequencies were assessed by Chi-squared test or by using the CLUMP program for rare alleles. Haplotypes were estimated using the ARLEQUIN program. Differences in the haplotype frequencies between the studied groups were assessed by the CLUMP program. No differences were observed in the allelic and genotypic distribution of all the investigated SNPs between control and periodontitis groups when they were analysed individually. The haplotypes distribution in the periodontitis and controls groups was significantly different both considering the total casuistic or the non-smokers subgroup only. Individuals with CTA haplotype seemed to be over twice more likely to develop periodontitis than individuals with other haplotypes (OR=2.14,

95% CI =1.36-3.38). The analysis of haplotypes constructed from -845(T/C), -738(T/A) and -353 (A/T) polymorphisms in the *IL8* gene demonstrated association with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

Keywords: Genetic, polymorphism; periodontitis; Interleukin-8; haplotypes.

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecciosa caracterizada por um processo inflamatório destrutivo que afeta os tecidos de proteção e suporte do dente¹⁴. Pode ocorrer formação de bolsas periodontais, recessões gengivais, reabsorção do osso alveolar, e eventual perda do dente¹⁴. Histologicamente a periodontite é caracterizada por acúmulo de células inflamatórias na porção extravascular do tecido conjuntivo gengival¹⁴. Numerosas espécies bacterianas têm sido isoladas da placa subgengival, sendo algumas estreitamente relacionadas ao início e progressão da doença⁶². Devido à maioria das bactérias periodontopatogênicas residirem nas bolsas periodontais, o sistema imune não consegue eliminar os microrganismos. Essa situação particular leva a uma inflamação crônica e a uma contínua resposta exacerbada do hospedeiro⁴³. Sendo que a disponibilidade de componentes do fluido gengival e do sangue promove o crescimento de espécies bacterianas gram-negativas com um aumento do potencial periodontopatogênico. Dessa forma, devido à alteração microbiana não contida, a resposta do hospedeiro resultará em uma seqüência de eventos, culminando com a destruição do tecido conjuntivo e do osso alveolar⁴³.

Os meios pelos quais as bactérias periodontopatogênicas iniciam e perpetuam a inflamação e a destruição tecidual características da periodontite têm sido área de investigação nos últimos anos^{50,62}. As bactérias associadas à doença podem causar destruição no periodonto marginal via dois mecanismos: 1) pela ação direta dos subprodutos de metabolismo e enzimas bacterianas; 2)

estimulando a liberação de mediadores inflamatórios de células hospedeiras, promovendo a autodestruição tecidual⁷². Assim, tanto bactérias com potencial patogênico quanto a qualidade da resposta do hospedeiro parecem constituir duas faces da etiologia da periodontite^{26,50,62}.

Como a periodontite tem caráter multifatorial, há influência do fumo, stress psicossocial e doenças sistêmicas como diabetes^{25,31,37,50}. Confirmando a relação de fatores genéticos, um estudo em gêmeos revelou que fatores genéticos são responsáveis por cerca de 50% da expressão da periodontite³⁸. Estudos de associação do tipo caso-controle^{27,44,68}, de análise de agregação familiar³³, e outros envolvendo gêmeos^{8,38} também têm investigado a influência genética na periodontite. Atualmente, acredita-se que fatores genéticos podem influenciar a suscetibilidade, progressão e/ou a resposta ao tratamento da doença periodontal, hipóteses que têm sido bastante investigadas e discutidas^{26,32,50}.

Vários estudos têm tentado identificar marcadores genéticos, especialmente em genes de citocinas, que determinariam a predisposição individual a periodontite^{20,22,27,41,42,54}. As citocinas constituem um grupo diverso de pequenas proteínas e glicoproteínas que regulam as respostas imunes, inflamatórias e de reparo. A maioria das citocinas tem sido agrupada de acordo com a função a elas atribuída em seis grupos: interleucinas, citocinas citotóxicas, fatores estimulantes de colônia, interferons, fatores de crescimento e quimiocinas⁷⁹. Algumas citocinas têm sido caracterizadas como pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-8 e antiinflamatórias como a IL-10, IL-13 e

o fator transformador de crescimento tipo beta (TGF- β). Doenças inflamatórias podem ser induzidas e perpetuadas por produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias ou possivelmente por diminuição na produção adequada de citocinas antiinflamatórias, sendo que uma falha no equilíbrio destas situações parece ocorrer na periodontite^{19,43}.

Foi demonstrado que pacientes com periodontite possuem maior nível de interleucinas nos tecidos gengivais do que pacientes sem periodontite, bem como que a concentração de interleucinas é maior nos sítios com doença ativa do que nos sítios inativos^{17,36}. Pesquisadores observaram também que a concentração gengival de IL-1 tende a diminuir com o tratamento periodontal⁶⁶.

Diferenças individuais nos níveis de interleucinas relacionados aos diferentes graus de suscetibilidade à periodontite podem ser atribuídas, entre outros fatores, a polimorfismos em seus respectivos genes. Como exemplo, a frequência do alelo 2 do polimorfismo *IL1B(+3953)* está aumentada em pacientes com periodontite avançada²⁰. Indivíduos homocigotos para o alelo 2 desse locus polimórfico, presente no exon 5, produzem a proteína IL1- β em um nível quatro vezes mais elevado⁴⁴. Indivíduos com genótipos positivos para IL-1 produzem 2 a 4 vezes mais IL-1 no fluido crevicular gengival^{11,44,61}.

O envolvimento de citocinas, bem como de seus polimorfismos genéticos em alguns genes como *IL1A*, *IL1B*, *IL2*, *IL6*, *IL10*, *VDR* (receptor de vitamina D), *TLR4* (receptor semelhante à *Toll* - 4), *MMP1* (metaloproteinase de matriz - 1) e *TNFA* (fator de necrose tumoral - alfa), têm sido cada vez mais investigados nas doenças inflamatórias, inclusive foram associados à severidade

e/ou suscetibilidade a periodontite crônica e periodontite agressiva^{1,6,15,20,27,54,55,65,74,77}. No entanto, o conhecimento que se obteve desses estudos mostrou que há necessidade de mais pesquisas nessa área para confirmar os resultados obtidos, o que deverá ser feito com populações etnicamente diferentes e com um número amostral maior²⁶. Além disso, é importante investigar polimorfismos, não somente em genes de citocinas, mas também em outras moléculas importantes nas doenças inflamatórias.

As quimiocinas regulam o trânsito de leucócitos, de forma que desempenham papéis importantes no desenvolvimento, homeostase e funções do sistema imune, além de terem efeito sobre células do sistema nervoso central e angiogênese. A IL-8 é uma quimiocina produzida principalmente por fagócitos mononucleares do sangue, mas também por células endoteliais, epiteliais, sinoviais, fibroblastos, condrócitos e tumorais^{2,3,32}. A IL-8 é uma quimiocina com forte função pró-inflamatória, pois media a ativação e migração de neutrófilos do sangue periférico ao tecido, além de atuar em monócitos, basófilos e linfócitos T, contudo com menor efeito do que em neutrófilos^{3,30}. A resposta dos neutrófilos a IL-8 é caracterizada por migração de células, liberação de enzimas contidas nos grânulos citoplasmáticos de secreção presentes no neutrófilo, e outras alterações intra e extracelulares^{2,3,60}. As enzimas contidas em grânulos de secreção são proteases neutras e ácidas e são liberadas no espaço pericelular. Constituintes do tecido conjuntivo são eficientemente degradados por essas enzimas liberadas por ativação².

A IL-1 α , IL-1 β e TNF α são potentes indutores de IL-8. Elevados níveis de IL-8 juntamente com imenso acúmulo de neutrófilos têm sido demonstrados em várias doenças. A observação de que os níveis de IL-8 são significativamente maiores em indivíduos com psoríase em relação aos indivíduos normais, sugere o envolvimento da IL-8 nessa doença inflamatória da pele. Vale acrescentar que altos níveis de IL-1 também são encontrados em indivíduos com psoríase, indicando que este poderia estar induzindo a produção de IL-8. A IL-8 pode ser o mediador do acúmulo de neutrófilos nos microabscessos que caracterizam tais lesões^{7,57}. Devido a IL-8 ser também produzida por células sinoviais estimuladas por IL-1, acredita-se que essa é a causa para a invasão de neutrófilos no líquido sinovial em indivíduos com artrite reumatóide⁵⁸. Assim, a interação entre a IL-8, IL-1 e TNF, além de outros mediadores da inflamação, leva ao extravasamento e recrutamento de neutrófilos em uma dada região inflamada².

IL 8 e a Doença Periodontal

Devido às propriedades quimioatrativas para neutrófilos, a IL-8 tem sido associada à patogênese de várias formas da periodontite^{3,13,16,72,76}. A IL-8 secretada localmente induz o extravasamento de neutrófilos do sangue periférico para o sítio afetado e também atrai numerosos neutrófilos presentes na lâmina própria e no epitélio gengival. Assim, apesar da ação de neutrófilos ser uma barreira inicial contra bactérias periodontopatogênicas, a contínua e excessiva presença de IL-8 pode contribuir para o acúmulo de neutrófilos com subsequente destruição de tecidos periodontais^{43,60,76}. Lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias

como *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* induzem a expressão de RNA mensageiro (RNAm) da IL-8 em fibroblastos de gengiva humana em cultura⁷¹, nas células do ligamento periodontal in vitro⁸⁰, além de estimular maior secreção da proteína pelas células do epitélio gengival²⁹ e pelos leucócitos⁴. A produção de IL-8 é estimulada por IL-1 α e TNF- α , que são expressos no periodonto inflamado⁷⁰. Foi detectada uma maior tendência de expressão da IL-8 e do seu receptor CXCR-1 em indivíduos com periodontite crônica e agressiva quando comparados a indivíduos sem doença¹⁸.

Até o momento não foi encontrado nenhum trabalho investigando polimorfismos no gene *IL8* em indivíduos com periodontite. Como cada vez mais se observa que polimorfismos genéticos podem alterar a taxa de transcrição de suas respectivas proteínas e que isso se relaciona com doenças multifatoriais, considera-se de grande importância contribuir com um maior entendimento da IL-8 na periodontite.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar se os polimorfismos -353(A/T), -738(T/A) e -845(T/C) no promotor do gene *IL8*, isoladamente e como haplótipos, estariam relacionados com a suscetibilidade à periodontite em uma população brasileira.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Cálculo da amostra

Foi utilizado o programa *Genetic Power Calculator*⁴⁵, para estimar a casuística, em outras palavras, o número amostral que deveria ser incluído no estudo para obterem-se *p*-valores estatisticamente relevantes. Os parâmetros considerados para características discretas, ou seja, não quantitativas em estudos de caso-controle foram semelhantes aos usados por Brett et al.⁵ (2005), incluindo a prevalência de 0,06 de periodontite crônica⁹.

Os cálculos mostraram que o tamanho da casuística necessária para comprovar associação da periodontite com polimorfismos genético, a um valor de α de 0,001 e poder de 95%, seria de 175 indivíduos em cada grupo. Portanto, a casuística investigada neste estudo foi suficientemente grande para detectar associação com um nível aceitável de confiança.

3.2 Seleção da amostra

O protocolo do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara-Unesp (CEP FOAr - UNESP 57/04) (Anexo1).

A casuística foi constituída por 500 indivíduos acima de 23 anos de ambos os gêneros e de qualquer grupo étnico-racial. Os indivíduos foram selecionados dentre os que buscaram o atendimento odontológico na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Foram excluídos indivíduos com menos de dez dentes na cavidade bucal, história de diabetes, infecção por HIV, alterações

periodontais agudas, antibioticoterapia nos últimos três meses, uso crônico de medicamentos antiinflamatórios, e em períodos de gravidez ou em lactação. Todos os participantes deste estudo foram informados e esclarecidos sobre os propósitos da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

Inicialmente foi realizada uma anamnese com a finalidade de avaliar a história médica e odontológica de cada indivíduo, seguida do exame clínico periodontal (Anexo 3). Os exames clínicos periodontais foram realizados por dois examinadores, previamente calibrados (κ ponderada=0,74), com a utilização da sonda periodontal tipo Williams (Trinity, Brasil). Os parâmetros clínicos profundidade de sondagem e perda de nível de inserção clínico (NIC) foram avaliados em seis sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual) de cada dente, além de sangramento à sondagem.

Assim, os indivíduos foram classificados em dois diferentes grupos:

- Grupo Periodontite (n = 276): indivíduos que apresentaram um ou mais sítios com profundidade de sondagem e NIC \geq 3 mm e sangramento à sondagem.
- Grupo Controle (n = 224): indivíduos que não apresentaram sítios com profundidade de sondagem e NIC \geq 3mm e sangramento à sondagem.

3.3 Coleta do material biológico

O material biológico escolhido para posteriormente extrair-se dele o DNA, foram células epiteliais da mucosa bucal que foram obtidas por meio de um bochecho com solução de glicose a 3%, por 2min. O tubo contendo o bochecho foi centrifugado a 2.000rpm durante 20min. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi mergulhado em tampão de extração (Tris 10mM, pH 7,8; EDTA 5mM; SDS 0,5%), transferido para um microtubo de 1,5 ml e armazenado a -20°C para posterior extração do DNA⁷³.

3.4 Extração e quantificação de DNA

O pellet de células da mucosa bucal foi descongelado e incubado durante uma noite com 100 ng/mL de proteinase K (Invitrogen) a 37°C.

O DNA foi extraído pelo método do fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), purificado com etanol e acetato de sódio a 3 M (pH 5,2)⁵³. O DNA foi quantificado com o auxílio de um espectrofotômetro (*Biophotometer*, Eppendorf), sendo a pureza estimada pela razão OD 260/280⁵¹. Após o procedimento de extração as amostras foram diluídas para a concentração de 100ng/μL e armazenados sob a temperatura de -20°C.

3.5 Análise dos polimorfismos genéticos

Em cada amostra de DNA, foram investigados os polimorfismos -353(A/T), -738(T/A) e -845(T/C) do gene *IL8* como descrito a seguir.

3.5.1 Loci -845 (T/C) e -738 (T/A)

Apesar de ter-se utilizado os *primers* descritos por Rovin et al.⁴⁹ (2002), as condições para amplificação do fragmento que contém esses dois loci (formando um *amplicon* de 1.527 pares de bases) foram modificadas e padronizadas neste laboratório.

As reações de *PCR* num volume final de 25 µL contiveram: 200 ng DNA genômico, Tampão 1x (*PCRx Amplification Buffer* - Invitrogen), 0,2 mM de dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, 1,5 mM de MgSO₄, 0,5x do aditivo *PCRx Enhancer* (Invitrogen) e 1,8 U de *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen- São Paulo, Brasil). As condições de ciclagem foram: 95°C por 3,2 min., seguidos de 35 ciclos de 95°C por 45 seg., 56°C por 30 seg. e 68°C por 2 min. Sendo a extensão final a 68°C por 8 min (Tabela1).

Em seguida, foi realizada a metodologia do *RFLP* (*restriction fragment lenght polymorphism*) para genotipar os indivíduos quanto ao locus -845 (T/C) e locus -738 (T/A), utilizando as enzimas de restrição *Vsp I* e *Xba I*, respectivamente. As reações de *RFLP*, num volume de 20 µl, contiveram 10 µl do produto da *PCR*, 3 U da enzima de restrição (*New England*) correspondente e 2,0 µl do tampão próprio da enzima. As reações foram incubadas por aproximadamente 12 horas (*overnight*) a 37°C, para permitir a digestão do produto da *PCR*.

3.5.2 Locus -353 (A/T) .

Optou-se pela utilização da técnica *SSP-PCR* (*Sequence Specific Primer – PCR*) descrita por Renzoni et al.⁴⁷ (2000) para análise do polimorfismo no locus -353 (A/T). Nesta técnica são utilizados *primers* específicos para identificar cada alelo, que em conjunto com um *primer* consenso, resulta num produto de *PCR* com o tamanho esperado, caso o alelo variante específico esteja presente. Simultaneamente, é adicionado em cada reação um par de *primers* de um outro gene, dito “controle”, para confirmar que a amplificação por *PCR* não ocorreu devida somente à inexistência de um dado alelo, o que impossibilita o pareamento com o *primer*, e não por deficiência de reagentes.

As condições da reação do *SSP-PCR* foram: 200 µM dNTP (*GE Healthcare Life Sciences*, Buckinghamshire, Inglaterra), tampão 1x (pH 8,4, solução 10x de 200 mM Tris-HCl e 500 mM KCl - Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 0,2 µM cada *primer* do gene controle (*DRB R/F*), 1,5 µM de cada *primer* para identificar o locus -353 do gene *IL8*, 2 mM de MgCl₂, 2 U de Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) e 200 ng de DNA, em um volume final de 13 µL. As condições de ciclagem foram: 96°C, 1 min; 96°C, 25 s; 70°C, 45 s; 72°C, 25 s - 5 ciclos; 96°C, 25 s; 65°C, 50 s; 72°C, 30 s - 21 ciclos; 96°C, 30 s; 55°C, 60 s; 72°C, 90 s – 4 ciclos (Tabela 1).

Para todos os loci estudados os fragmentos resultantes foram aplicados em gel de poliacrilamida a 10% e submetidos à eletroforese vertical em cuba contendo tampão TBE 1x (tampão Tris-Borato-EDTA, pH 8,4) para possibilitar a detecção de genótipos ou para verificar a amplificação do produto da *PCR* para

posterior digestão com enzima de restrição. Para identificar o peso das bandas foram utilizados marcadores de peso molecular de 100 pares de base (pb) (Amresco) e *PhiX 174* digerido com *Hae III* (Invitrogen). Os géis foram corados com nitrato de prata⁵², visualizados e fotografados digitalmente por meio do fotodocumentador GDS 8000 System (UVP, Upland, CA, USA) (Figuras 1 e 2).

Tabela 1 - Sequências dos *primers*, condições de ciclagem da *PCR* e enzimas de restrição utilizadas para determinar os genótipos

Polimorfismo	<i>Primers</i> , condições de ciclagem e digestão	Produtos (alelos)
-845(T/C) (<i>RFLP</i>)	F - GAATTCAGTAACCCAGGCAT R – AAGCTTGTGTGCTCTGCTGTC	1527 pb
	95°C, 3,2 min; 95°C, 45 s; 56°C, 30 s; 68°C, 2 min - 35 ciclos; 68°C, 8 min. Enzima de restrição: <i>Ase I</i> (<i>New England</i>)	791 + 736 (T) 1527 (C)
-738(T/A) (<i>RFLP</i>)	F - GAATTCAGTAACCCAGGCAT R – AAGCTTGTGTGCTCTGCTGTC	1527 pb
	95°C, 3,2 min; 95°C, 45 s; 56°C, 30s; 68°C, 2 min - 35 ciclos; 68°C, 8 min. Enzima de restrição <i>Xba I</i> (<i>New England</i>)	1212 + 317 (A) 847 + 365 + 317 (T)
-353(A/T) (<i>SSP-PCR</i>)	F- GTG GAACTGATTTCTATGTGAA R - CACAATTTGGTGAATTATCAAT/A	319 pb
	Controle <i>DRB</i> F - TGCCAAGTGGAGCACCCAA Controle <i>DRB</i> R- GCATCTTGCTCTGTGCAGAT 96°C, 1 min; 96°C, 25 s; 70°C, 45 s, 72°C, 25 s - 5 ciclos; 96°C, 25 s; 65°C, 50 s; 72°C, 30 s - 21 ciclos; 96°C, 30 s; 55°C, 60 s; 72°C, 90 s - 4 ciclos.	796 pb

F=*foward*, R= *reverse*; pb = pares de bases; *DRB* (lócus do *HLA*, ou antígeno leucocitário humano).

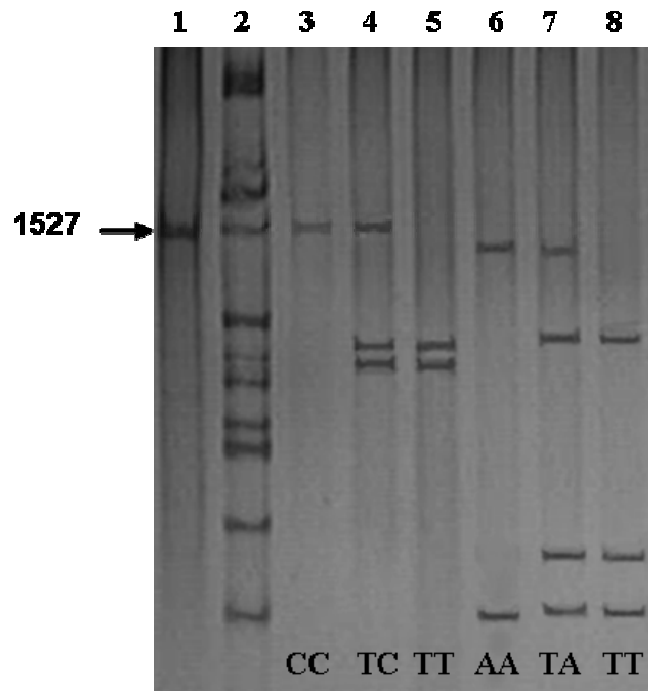


FIGURA 1- PCR-RFLP em gel de poliacrilamida a 10% para detecção dos polimorfismos nos loci -845(T/C) e -738(T/A).

Lane 1: amplificação da banda 1527 por PCR.

Lane 2: marcador de peso molecular 100 pb

Lanes 3-5: -845(T/C). CC = 1527 pb; TC = 1527 + 791 + 736 pb; TT = 791 + 736 pb.

Lanes 6-8: -738(T/A). AA = 1212 + 317 pb; TA = 1212 + 847 + 365 + 317 pb; TT = 847 + 365 + 317 pb.

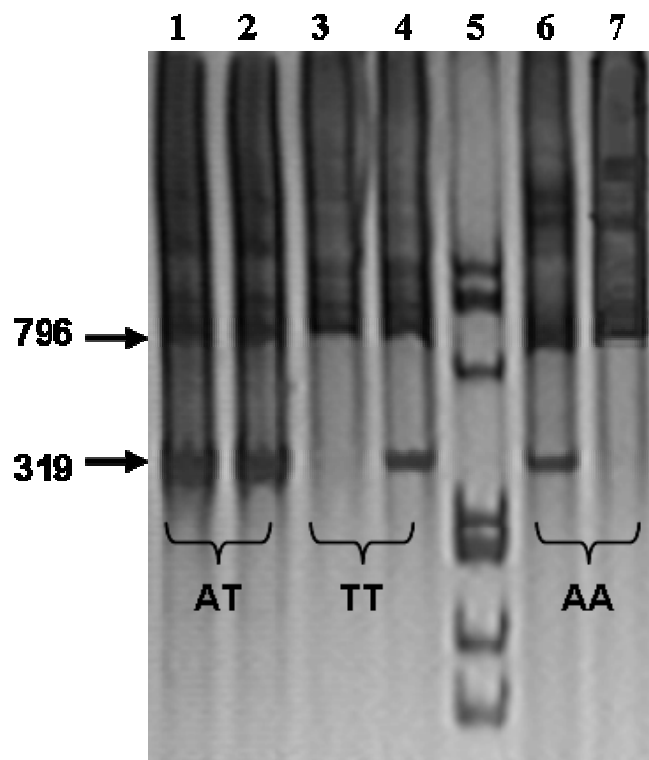


FIGURA 2 – *SSP-PCR* em gel de poliacrilamida a 10% para genotipagem do locus -353 (A/T), onde cada dois *lanes* indicam o genótipo de um indivíduo. Para cada indivíduo era aplicado no primeiro *lane* a reação específica para o alelo A e no segundo *lane* a reação para o alelo T.

Lanes 1-4,6 e 7: banda do gene *DRB* (controle) com 796 pb.

Lanes 1, 2, 4 e 6: banda do gene *IL8* com 319 pb.

Lane 5: Marcador de peso molecular *PhiX 174* digerido com *Hae III*.

3.6. Análise estatística

Associação entre polimorfismos genéticos e doença periodontal foi avaliada através dos testes de χ^2 e *odds ratio* por meio do programa BioEstat v.4.0 (UFPA, MCT, CNPq, Belém, PA, Brazil). Na presença de genótipos com frequência baixa, ou seja, raros, foi utilizado o programa CLUMP* que emprega o método de simulações de Monte Carlo⁵⁹. A distribuição de cada polimorfismo em cada grupo (Controle e Periodontite) foi testada quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg por meio do programa ARLEQUIN⁵⁶, o qual também foi utilizado para investigar desequilíbrio de ligação entre os loci e a frequência estimada dos possíveis haplótipos. A seguir, a frequência de haplótipos nos diferentes grupos foi confirmada por contagem manual, para acessar por meio do programa CLUMP*, se a distribuição destes se mostrava diferente entre os indivíduos com e sem doença periodontal. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%.

* Software written by Dave Curtis [acesso em 2007/09/23].
Disponível em: <http://www.mds.qmw.ac.uk/statgen/dcurtis/software.html>

4 CAPÍTULOS

4.1 Capítulo 1

Influência de fatores genéticos na etiopatogênese da doença periodontal

Kim YJ, Viana AC, Scarel-Caminaga RM. **Influences of genetic factors in the etiopathogenesis of periodontal disease.** Rev Odontol UNESP. 2007; 36(2): 175-180.

Influência de fatores genéticos na etiopatogênese da doença periodontal

Influences of genetic factors in the etiopathogenesis of Periodontal disease

Yeon. J. KIM*

Aline C. VIANA*

Raquel M. SCAREL-CAMINAGA**

* Pós-Graduanda em Periodontia, Nível Mestrado – Faculdade de Odontologia – UNESP – 14801-903 Araraquara - SP

** Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 14801-903 Araraquara - SP

Resumo: A doença periodontal (DP) tem caráter multifatorial, a infecção por microrganismos periodontopatogênicos que leva à inflamação e à destruição do periodonto é modulada pela resposta imune do hospedeiro, a qual é influenciada por hábitos como o fumo. Fatores relacionados ao hospedeiro no contexto da DP têm sido bastante estudados nos últimos anos, principalmente no que se refere à imunogenética, fato que motivou esta revisão da literatura, que teve como objetivo comentar a influência que fatores genéticos podem desempenhar na etiopatogênese da DP, dando ênfase aos polimorfismos genéticos. O levantamento bibliográfico foi realizado nas bases de dados *Bireme* e *PubMed* utilizando-se os termos “Periodontite, Genética e Polimorfismos”. Estudos sobre genética humana foram selecionados de forma a apresentar relação positiva ou negativa de fatores genéticos importantes, como polimorfismos, na DP. Concluiu-se pelos crescentes

trabalhos na área que, apesar de ser inegável a influência genética na DP, ainda são necessários muitos outros estudos para melhor compreender esse mecanismo.

Palavras-chave: Periodontite; polimorfismos; genética.

Abstract: *Periodontal diseases (PD) encompass multifactorial diseases due to the infection caused by periodontopathogenic microorganisms resulting in inflammation and periodontal destruction, are modulated by the host response. The immune response is influenced by host habits such as smoking. Important host factors regarding PD have been investigated in the last years, especially in immunogenetics. The aim of this literature review was to comment about genetic factors that might influence periodontal diseases. A search of Bireme and PubMed data bases was performed using terms like “Periodontitis, Genetics and Polymorphisms”. Important studies focusing on human genetics in individuals with periodontitis were selected to demonstrate positive and negative relationship between genetics factors, like polymorphisms, and PD. It can be concluded, considering the crescent number of studies in this area, that PD is influenced by genetic factors, although more researches are necessary to better understand which mechanisms are involved in this process.*

Keywords: Periodontitis; polymorphisms; genetics.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) acomete indivíduos em todo o mundo. Estima-se que a forma severa da doença atinja cerca de 10% dos adultos¹. No

Brasil, em 1986, um levantamento epidemiológico feito pelo Ministério da Saúde em capitais de 16 Estados revelou que 7,4% dos indivíduos com 50 a 59 anos tinham um ou mais sítios com profundidade à sondagem $\geq 5,5$ mm. Uma pesquisa realizada no Rio Grande do Sul revelou que aproximadamente 65% da população estudada apresentavam dentes com profundidade à sondagem $\geq 5,5$ mm².

Nos últimos anos tem sido investigada a influência da saúde bucal no estado de saúde geral do indivíduo. Um crescente corpo de evidências científicas sugere associação entre infecção oral e doenças sistêmicas como aterosclerose, distúrbios cardiovasculares, artrite, diabetes e doenças pulmonares³. Nesse contexto, a DP tem se mostrado um problema de saúde pública de grande seriedade.

Está bem estabelecida que a DP crônica é uma doença infecciosa caracterizada por um processo inflamatório destrutivo que afeta os tecidos de suporte do dente. Clinicamente, podem ser formadas bolsas periodontais, reabsorção do osso alveolar e eventual perda do elemento dental⁴. Histologicamente é caracterizada por acúmulo de células inflamatórias na porção extravascular do tecido conjuntivo gengival⁵. Além disso, numerosas espécies bacterianas têm sido isoladas da placa subgengival, sendo algumas estreitamente relacionadas ao início e à progressão da doença⁶. Devido à maioria das bactérias periodontopatogênicas residirem nas bolsas periodontais, o sistema imune tem dificuldade em eliminar esses microrganismos. Ocorre recrutamento de leucócitos e subsequente liberação de mediadores inflamatórios, resultando em inflamação crônica e destruição do tecido⁷.

Bactérias periodontopatogênicas como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Treponema denticola*, entre outras, iniciam e perpetuam a inflamação podendo causar destruição do periodonto marginal via dois mecanismos: 1) pela ação direta dos subprodutos do metabolismo e enzimas bacterianas; 2) estimulando a liberação de mediadores inflamatórios de células do hospedeiro⁸. No entanto, embora a infecção por periodontopatógenos seja essencial para o início da DP, sua mera presença na cavidade oral não é suficiente para explicar diferenças interindividuais na severidade da doença⁹. Em uma população homogênea acompanhada por 15 anos, foram observadas diferenças na taxa de progressão da DP. Isso levantou a hipótese de que características individuais do hospedeiro influenciariam o curso da doença¹⁰.

Além da infecção por periodontopatógenos e da resposta do hospedeiro, o caráter multifatorial da DP sofre influência de fatores de risco como fumo¹¹ e diabetes¹², além de indicadores de risco como stress psicossocial¹³ e osteoporose¹⁴. Nas doenças de caráter multifatorial, é muito difícil quantificar qual a influência de fatores ambientais e fatores genéticos.

A participação da genética na etiologia da DP é indicada por: 1) resultados de estudos com gêmeos; 2) agregação familiar observada na periodontite agressiva; 3) síndromes onde a periodontite é uma característica clínica importante¹⁵. Tem se observado grande interesse da comunidade científica internacional sobre o papel que os fatores genéticos podem desempenhar na DP e como os resultados seriam aplicados no prognóstico da doença. Portanto, foi

realizada uma revisão bibliográfica com o objetivo de apresentar de forma sucinta alguns dos trabalhos mais relevantes na área.

MÉTODO

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados *Bireme* e *Pubmed*, utilizando os termos “Periodontite, Genética e Polimorfismos”. Foram encontradas 300 referências na *Bireme* (89% no MEDLINE) e 1.281 referências no *PubMed* (incluindo genética de periodontopatógenos), dos quais 126 referências focadas em polimorfismos genéticos humanos, 14 revisões de literatura e 13 trabalhos que discutem testes genéticos para identificar suscetibilidade à periodontite. Entre estes, foram selecionados artigos considerados como os que melhor apresentavam resultados positivos ou negativos da influência genética na DP, além de algumas revisões de literatura publicadas por grupos de pesquisa renomados internacionalmente.

A GENÉTICA NO ESTUDO DA DOENÇA PERIODONTAL

1 – Estudos com gêmeos

Uma boa maneira de avaliar os aspectos genéticos da DP é por meio de estudos realizados com gêmeos. Geralmente é feita uma comparação entre gêmeos monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ), pela qual é avaliado o grau de concordância ou discordância de uma ou mais características¹⁶. Ao analisar fatores genéticos, espera-se que as taxas de concordância entre gêmeos MZ sejam maiores do que em gêmeos DZ. No entanto, quando são avaliados fatores

ambientais, são esperadas taxas semelhantes de concordância entre os dois grupos de gêmeos.

Em um estudo realizado com 110 gêmeos adultos, foi avaliada a condição periodontal pela profundidade de sondagem e pelos nível de inserção, índice gengival e índice de placa. A população estudada consistiu de 63 pares de gêmeos MZ (criados juntos), 33 pares de gêmeos DZ (mesmo sexo e criados juntos) e 14 pares de gêmeos MZ (criados separadamente). Foi observado que a correlação da DP entre os gêmeos MZ criados juntos foi significativamente maior do que a encontrada nos gêmeos DZ¹⁷. Enfocando a influência de fatores ambientais como o hábito de fumar e o uso de serviço odontológico, outros 117 pares de gêmeos foram estudados (64 MZ e 53 DZ). Estimou-se que a periodontite crônica possui aproximadamente 50% de hereditariedade, mesmo após ajustes para as variáveis comportamentais¹⁸.

A influência que fatores genéticos individuais teriam sobre a presença intrabucal de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens* e *Fusobacterium nucleatum* foi avaliada em um estudo realizado com 169 gêmeos com periodontite agressiva. Em gêmeos criados separadamente (21 MZ e 17 DZ) e gêmeos criados no mesmo ambiente familiar (83 MZ e 48 DZ), a prevalência bacteriana nos indivíduos foi de 11% para *P. gingivalis*, 22% para *A. actinomycetemcomitans*, 19% para *P. intermedia*, 0,34% para *E. corrodens* e 40% para *F. nucleatum*. Para todas as espécies bacterianas avaliadas, as taxas de concordância não foram significativamente diferentes entre gêmeos MZ e DZ, apesar de haver similaridades entre os hábitos desses

indivíduos. Além disso, os gêmeos MZ criados juntos não apresentaram similaridade maior à encontrada para os gêmeos MZ criados separadamente¹⁹.

De acordo com os resultados desses estudos, pode-se concluir que fatores genéticos exercem maior influência na herança da periodontite do que fatores relacionados ao ambiente, como a presença de microrganismos e hábitos comportamentais.

2 – Estudos com Famílias

A agregação familiar da periodontite agressiva (PA) motivou a investigação de um possível envolvimento da genética nessa patologia. A presença de PA entre irmãos da mesma família tem sido relatada por diversos estudos²⁰⁻²¹. Pesquisadores avaliaram 631 indivíduos pertencentes a diferentes famílias, dos quais 106 apresentaram periodontite juvenil localizada, 130 periodontite juvenil generalizada, 254 não eram afetados e 141 indivíduos tinham situação periodontal desconhecida. Foi concluído que o modo mais provável de herança seria o autossômico dominante, tanto em famílias de caucasianos como de afro-americanos²².

A periodontite crônica também se concentra em famílias, como é sugerido em um estudo que analisou 24 famílias holandesas, nas quais, em cada uma, havia, pelo menos, uma pessoa afetada pela periodontite crônica: além do cônjuge, 1 a 3 filhos. Foi demonstrado que as crianças com menos de 5 anos de idade não foram afetadas pela periodontite. No grupo de 5 a 15 anos, 21% tinham pelo menos uma bolsa ≥ 5 mm associada à perda de inserção e, no grupo de 10 a 15 anos, esse valor correspondia a 45%²⁰.

Embora os resultados obtidos de estudos com famílias sugiram uma forte predisposição genética, os estudos com gêmeos mostram-se mais confiáveis na comprovação da influência da genética na etiopatogênese da DP, pois gêmeos MZ praticamente não apresentavam variabilidade genética entre si. Comparativamente, indivíduos da mesma família têm maior variação genética entre si (considerando genes polimórficos); portanto, o fator genético como variável do estudo não se apresenta tão bem normalizado quanto nos estudos com gêmeos. Ainda assim, estudos com famílias para comprovar influência genética relacionada a doenças complexas são realizados com frequência. Nesses casos, apesar de a influência dos fatores ambientais ser de grande importância, deve-se considerar que os resultados da influência genética terão maior confiabilidade quanto maior for o número de famílias estudadas e melhor padronizadas forem as variáveis ambientais entre elas.

3 – Estudos populacionais enfocando polimorfismos genéticos

A grande maioria dos estudos sobre fatores genéticos e DP é baseada em análises de indivíduos não aparentados, principalmente quando se investiga polimorfismos genéticos. Um polimorfismo genético é caracterizado pela ocorrência de, pelo menos, dois alelos em um locus, quando o alelo mais raro deve ter frequência superior a 1% na população²³. Os polimorfismos preferencialmente investigados são aqueles presentes em genes que participam da resposta imune do hospedeiro, da sinalização intracelular ou das vias enzimáticas de degradação tecidual²⁴. Nota-se uma tendência mundial em identificar marcadores genéticos de suscetibilidade não só à DP, mas a doenças importantes

como câncer, diabetes, doenças inflamatórias e auto-imunes, como artrite, asma, lúpus eritematoso sistêmico, entre outras²⁵⁻³⁰.

Os primeiros polimorfismos investigados na DP foram nos genes que formam o “*cluster*” ou agrupamento da Interleucina 1 (*IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*), além do gene do Fator de necrose Tumoral- α (*TNFA*). Observou-se correlação dos polimorfismos -889 *IL1A* e +3953 *IL1B* com a severidade à DP em indivíduos não-fumantes⁹. O envolvimento do genótipo composto da IL-1 na DP foi também relacionado ao risco de perda dentária⁹. Pacientes em manutenção do tratamento periodontal por 5 a 14 anos que apresentavam o genótipo composto da IL-1 tinham 2,7 vezes mais risco de perder dentes do que indivíduos que não apresentavam tais polimorfismos³¹. Quando combinado ao fumo intenso, o genótipo composto da IL-1 representou um aumento no risco de perda dental em 7,7 vezes³¹.

Diferenças individuais nos níveis de interleucina relacionados aos diferentes graus de suscetibilidade à DP são atribuídas a polimorfismos nos genes de citocinas. Como exemplo, a frequência do alelo 2 do polimorfismo +3953 *IL1B* está aumentada em pacientes com DP avançada³². Um determinado genótipo nesse locus está associado a um aumento de quatro vezes na produção da proteína³³.

Foi também encontrada relação entre fumo, idade, presença de *P. gingivalis* e o genótipo composto da IL-1, sugerindo que este seria um fator adjuvante de suscetibilidade à periodontite³⁴. Outro estudo demonstrou a frequência elevada do genótipo composto, além de polimorfismos em genes

receptores antagonistas, em pacientes não-fumantes nos quais não foi encontrada a presença de *P. gingivalis*, nem de *A. actinomycetemcomitans*, sugerindo a influência dos polimorfismos mesmo na ausência de outros prováveis fatores de risco³⁵. Porém, não foram encontrados resultados significativos em estudos com indivíduos de origem chinesa e afro-americana, já que eles dificilmente apresentam o genótipo composto da IL-1³⁶. Estudo realizado em uma família brasileira com PA analisou microrganismos periodontopatogênicos e polimorfismos nos genes da interleucina 1 (*IL1A*, *IL1B*), do receptor do antagonista da IL-1 (*IL1RN*) e do fator de necrose tumoral- α (*TNFA*), obtendo resultados negativos de associação com a doença²¹. Os mesmos polimorfismos nos genes *IL1A* e *IL1B*, quando investigados em 70 indivíduos europeus não aparentados, apresentaram forte associação ($p=0,01$) com a PA³⁷. Polimorfismos no gene *IL1RN* mostraram-se significativamente diferentes em indivíduos japoneses com PA ($p=0,007$)³⁸.

Determinados polimorfismos no “cluster” da IL-1 estão relacionados à DP em diferentes populações. Alguns alelos desses polimorfismos mostraram-se raros em algumas populações e prevalentes em outras, ou seja, apresentaram frequências alélicas diferentes em populações distintas. Portanto, apesar da importância da IL-1 na resposta imune do indivíduo, não se pode utilizar seus polimorfismos como marcadores genéticos da DP.

Outras pesquisas foram realizadas buscando relacionar polimorfismos em citocinas com DP. Citocinas, como as interleucinas, atuam como mediadores-chave do processo inflamatório, pois modulam a síntese e a

degradação de componentes da matriz extracelular e óssea que contribuem com o periodonto³⁹.

Outros polimorfismos em citocinas como IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 e TNF- α têm sido positivamente ou negativamente relacionados à DP dependendo da população estudada⁴⁰⁻⁴⁴. Foi observada associação da severidade da doença periodontal com polimorfismos no promotor dos genes *IL2*⁴⁵, *IL6*⁴⁶, metaloproteinase 9 (*MMP9*) associada a *TIMP2*⁴⁷, entre outros. Com relação a polimorfismos na interleucina 4 (IL-4), dois estudos falharam em associá-los à DP⁴⁸⁻⁴⁹. Entretanto, em indivíduos europeus não aparentados que apresentavam PA foi relatada associação ($p < 0,01$) de polimorfismos no promotor e no intron da IL-4. Além disso, 27,8% desses indivíduos tinham uma combinação de polimorfismos que foi relacionada a níveis não detectáveis de IL-4 no sangue quando comparados com o grupo controle⁵⁰.

Investigando o gene *IL10*, dois polimorfismos na região promotora estão associados à DP, observando-se que determinados haplótipos formados por tais polimorfismos aumentam a suscetibilidade à doença em até 8 vezes²¹. Em relação à PA, microssatélites no promotor da IL-10 não apresentaram diferenças significativas nas frequências dos alelos entre 79 pacientes caucasianos com a PA e o grupo controle⁵¹. Quando polimorfismos de base única no promotor do gene *IL10* foram investigados, também não foi possível estabelecer relação com a PA em indivíduos japoneses⁵².

Considerando conjuntamente os vários artigos consultados, observou-se que há grande variedade entre eles no que se refere a: I) critérios

clínicos adotados para determinar quais indivíduos manifestam DP e quais indivíduos não (grupo controle); II) diferentes etnias investigadas. Por outro lado, foram notadas várias semelhanças entre os diferentes trabalhos: I) número amostral pequeno, comparando-se a trabalhos de genética de populações, o que confere um baixo poder estatístico dos resultados; II) geralmente o método empregado para investigar polimorfismos genéticos foi o PCR-RFLP (amplificação do gene de interesse por Reação em Cadeia da Polimerase seguida de identificação de Polimorfismos por Comprimento dos Fragmentos de Restrição).

Similarmente às considerações estabelecidas para o “*cluster*” da IL-1, polimorfismos genéticos em outras citocinas também foram relacionados com suscetibilidade e/ou progressão da DP em determinadas populações⁵³. Entretanto, devido à variabilidade da frequência alélica desses polimorfismos nas diferentes etnias, nenhum dos polimorfismos até agora investigados podem ser utilizados como marcadores genéticos da DP.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se, baseado nos estudos com gêmeos e com famílias, que há evidência científica da influência genética na etiopatogênese da DP. No entanto, os mecanismos pelos quais os fatores genéticos podem atuar no início e/ou progressão da DP não foram ainda completamente compreendidos.

Acredita-se que, futuramente, conforme progredir o conhecimento de polimorfismos genéticos e suas frequências em vastas populações de diferentes

etnias, as pesquisas que venham a investigar relação entre polimorfismos e doenças terão um grande salto na qualidade e na aplicação dos seus resultados. A identificação de populações mais suscetíveis a determinados tipos de doenças, dado a sua carga genética, poderia nortear políticas de saúde pública, principalmente no que se refere à prevenção.

Tomando como exemplo a DP, é importante identificar o maior número possível de polimorfismos genéticos e suas frequências nas populações em todo o mundo para que se possa atribuir a um determinado polimorfismo, com segurança, uma porcentagem de suscetibilidade ou severidade à doença. Somente no futuro, e baseado no conhecimento das frequências dos alelos nas populações, é que um determinado polimorfismo poderia ser utilizado como marcador genético da DP. Assim, poderia ser confeccionado um “kit”, talvez adaptado para a população em questão, para detectar indivíduos com genótipo de alto risco para a doença, auxiliando também no prognóstico da DP.

AGRADECIMENTOS

FAPESP 2003/10424-0 e 2005/03231-7

REFERÊNCIAS

- 1- Hart AC. Genetic considerations of risk in human periodontal disease. *Curr Opin. Periodontol.* 1994;3:3-11.

- 2- Susin C, Valle P, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Occurrence and risk indicators of increased probing depth in an adult Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 123-9.
- 3- Cohen DW, Slavkin HC. Periodontal disease and systemic disease. In: Rose LF, Genco RJ, Cohen DW, Mealey BL. *Periodontal Medicine*. Hamilton: B.C. Decker; 2000. p.2.
- 4- Flemmiig T. Periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999; 4: 32-7.
- 5- Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976; 33: 235-49.
- 6- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 134-44.
- 7- Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998; 9: 248-66.
- 8- Tonetti MS, Mombelli A. Early onset periodontitis. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, editors. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 3rd ed. Copenhagen: Munksgaard ; 1997. p. 227-57.
- 9- Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*. 1997; 14: 33-53.
- 10- Loe H. Periodontology in the past 20 years. *Tandlaegebladet*. 1986;90 (18): 788-94.
- 11- Johnson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. *J Dent Educ*. 2001; 65: 313-21.

- 12- Mealy BL. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. *Compend Contin Educ Dent.* 2000; 21: 943-6.
- 13- Linden GJ, Mullally BH, Freeman R. Stress and the progression of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 675-80.
- 14- Shen EC, Gau CH, Hsieh YD, Chang CY, Fu E. Periodontal status in post-menopausal osteoporosis: a preliminary clinical study in Taiwanese women. *J Chin Med Assoc.* 2004; 67: 389-93.
- 15- Schenkein HA. Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the climb worth the view? *Periodontol 2000.* 2002; 30: 79-90.
- 16- Corey LA, Nance WE, Hofstede P, Schenkein HA. Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. *J Periodontol.* 1993; 64: 1205-8.
- 17- Michalowicz BS, Aeppli, D, Virag, JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, et al. Periodontal findings in adults twins. *J Periodontol.* 1991; 62: 293-9.
- 18- 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: 1699-707.
- 19- Michalowicz BS, Wolf LF, Klump D, Hinrichs JE, Aeppli DM, Bouchard TJJ, et al. Periodontal bacteria in adult twins. *J Periodontol.* 1999; 70: 263-73.
- 20- Boughman JA, Astemborski JA, Suzuki JB. Phenotypic assessment of early onset periodontitis in sibships. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 233-9.

- 21- Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MA, Goncalves RB, Sallum AW, Line SR. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 233-9.
- 22- Marazita ML, Burmeister JA, Gunsolley JC, Koertge TE, Lake K, Schenkein HA. Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 1994; 65: 623-30.
- 23- Borges-Osório MR, Robinson, WM. *Genética humana.* 2^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.
- 24- Shapira L, Wilensky A, Kinane DF Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl 6): 72-86.
- 25- Tchetverikov I, Lohmander LS, Verzijl N, Huizinga TW, TeKoppele JM, Hanemaaijer R, et al. MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64: 694-8
- 26- Tsiavou A, Hatziagelaki E, Chaidaroglou A, Manginas A, Koniavitou K, Degiannis D, et al. TNF-alpha, TGF-beta1, IL-10, IL-6, gene polymorphisms in latent autoimmune diabetes of adults (LADA) and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Immunol.* 2004; 24:591-9.

- 27- McCarron SL, Edwards S, Evans PE, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res.* 2002; 62: 3369-72.
- 28- Hobbs K, Negri J, Klinnert M., Rosenwasser LJ, Borish, L. Interleukin-10 and Transforming growth factor- β promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Resp Crit Car Med.*1998; 158: 1958-62.
- 29- Hajeer AH, Lazarus M, Turner D, Mageed RA, Vencovsky J, Sinnott P, et al. IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1998; 27: 142-5.
- 30- Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, et al. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1997; 24: 2314-7.
- 31- McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol.* 1999; 70: 49-56.
- 32- Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukine-1beta +3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 781-5.
- 33- Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest.* 1992; 22: 396-402.
- 34- Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Lang NP, et al. A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and

- periodontal disease in a general adult population. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 1137-44.
- 35- Laine ML, Farre MA, Gonzalez G, van Dijk LJ, Ham AJ, Winkel EG, Crusius JB, et al. Polymorphisms of the interleukin-1 gene family, oral microbial pathogens, and smoking in adult periodontitis. *J Dent Res.* 2001; 80: 1695-9.
- 36- Armitage GC, Wu Y, Wang HY, Sorrell J, di Giovine FS, Duff GW. Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *J Periodontol.* 2000; 71: 164-71.
- 37- Parkhill JM, Henning BJ, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 682-9.
- 38- Tai H, Endo M, Shimada Y, Gou E, Orima K, Kobayashi T, Yamazaki K, et al. Association of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms with early onset periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 882-8.
- 39- Trevillato PC, Sallum AW, Line SRP. Diagnóstico molecular da doença periodontal. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2001; 5: 100-3.
- 40- Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SRP. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 443-8.
- 41- Komatsu Y, Tai H, Galicia JC, Shimada Y, Endo M, Akazawa K, et al. Interleukin-6 (IL-6)--373 A9T11 allele is associated with reduced

- susceptibility to chronic periodontitis in Japanese subjects and decreased serum IL-6 level. *Tissue Antigens*. 2005;65:110-4.
- 42- Folwaczny M, Glas J, Torok HP, Tonenchi L, Paschos E, Bauer B, et al. Polymorphisms of the interleukin-18 gene in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 530-4.
- 43- Shapira L, Stabholz A, Rieckmann P, Kruse N. Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promoter region in families with localized early-onset periodontitis. *J Periodontal Res*. 2001; 36: 183-6.
- 44- Galbraith GM, Steed RB, Sanders JJ, Pandey JP. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumornecrosis factor genotype. *J Periodontol*. 1998;69: 428-33.
- 45- Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito Jr RB, Line, SRP. Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002; 29: 587-91.
- 46- Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito Jr RB, Souza AP, Line SRP. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 438-42.
- 47- de Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito Jr RB, Line SRP. Analysis of the MMP-9 (C-1562 T) and TIMP-2 (G-418C) gene promoter polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 207-11.

- 48- Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB Jr, Line SR. Investigation of IL4 gene polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 341-5.
- 49- Pontes CC, Gonzales JR, Novaes Jr AB, Taba Jr M, Grisi MFM, 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: 241-6.
- 50- Michel J, Gonzales JR, Wunderlich D, Diete A, Herrmann JM, Meyle J. Interleukin-4 polymorphism in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 483-8.
- 51- Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodontal Res.* 1999; 34: 379-86.
- 52- Yamazaki K, Tabeta K, Nakajima T, Ohsawa Y, Ueki K, Itoh H, et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Japanese patients with adult and early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 828-32.
- 53- Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl 6): 159-79.

4.2 Capítulo 2

Lack of association of a functional polymorphism in the *Interleukin 8* gene with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals

Artigo a ser submetido para publicação

**Lack of association of a functional polymorphism in the *Interleukin 8* gene
with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals**

Yeon J. Kim, Aline C. Viana, Karen M. C. Curtis, Silvana R. P. Orrico, Joni A. Cirelli, Raquel M. Scarel-Caminaga*

Y. J. Kim, A. C. Viana, S. P. Orrico, J. A. Cirelli - Department of Oral Diagnosis and Surgery;

K. M. C. Curtis, R. M. Scarel-Caminaga – Department of Morphology, School of Dentistry at Araraquara, UNESP- São Paulo State University, SP, Brazil.

*Correspondence: Dr. Raquel M. Scarel-Caminaga. Department of Morphology, School of Dentistry at Araraquara, UNESP- São Paulo State University, CP. 331, CEP 14801-903, Araraquara, SP, Brazil. E-mail: raquel@foar.unesp.br

ABSTRACT

Background: Interleukin-8 (IL-8) is an important inflammatory mediator that is responsible for the migration and activation of neutrophils. It is involved in the initiation and amplification of acute inflammatory reactions and in the chronic inflammatory process. The functional single nucleotide polymorphism (rs4073) in the *IL8* gene may influence the expression of the protein and has been associated with inflammatory diseases.

Objective: The purpose of this study was to investigate the potential association of the polymorphism (rs4073) in the promoter region of the *IL8* gene with the susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

Methods: DNA was extracted from buccal epithelial cells of 500 Brazilian individuals (control group n=224 and periodontitis group n=276). The polymorphism was genotyped by the sequence-specific primer polymerase chain reaction (SSP-PCR) method. The data were analyzed by χ^2 test and to estimate the risk to develop periodontitis associated with an allele or genotype, the odds ratio was calculated.

Results: The genotype distributions both in the control and periodontitis groups were consistent with the assumption of Hardy-Weinberg equilibrium. No Significant differences were found in allelic and genotypic frequencies between the control and periodontitis groups.

Conclusion: The single nucleotide polymorphism (rs4073) in the *IL8* gene was not associated with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

Key Words: IL-8, polymorphism, association, periodontitis

INTRODUCTION

Periodontitis is a multifactorial disease whose manifestation and progression are determined by the host response to bacterial infection. The host response is influenced by both environmental factors (*e.g.* smoking, oral hygiene, stress, and lifestyle) and genetic factors¹. Some gene of molecules important in the panel of inflammation such as interleukin-1 (IL-1), interleukin-10 (IL-10) tumor necrosis factor- α (TNF- α) Fc- γ receptors and matrix metalloproteinase (MMP) have been investigated as candidate genes for periodontal disease susceptibility^{4,5,6,12,19,20,35,47}. Several studies have demonstrated that single

nucleotide polymorphisms (SNPs) in cytokine genes may influence the susceptibility to periodontal diseases and their severity^{20,24,34,35,41,44}.

Interleukin 8 is a potent chemoattractant and activator of neutrophils in inflammatory regions³. In the periodontal tissue, neutrophils are the first line of defense against periodontopathic bacteria, and play an important role in pathogenesis of periodontitis⁴³. The role of IL-8 in the pathological process of chronic periodontal diseases has been previously investigated. The protein levels of the IL-8 detected in gingival crevicular fluid from patients with chronic periodontal disease was significantly higher than in controls⁴². Further, Takigawa et al.³⁸ (1994) have demonstrated that fibroblasts from inflamed periodontal tissue produced IL-8 by stimulation with IL-1 β and TNF- α in a dose-dependent manner. The IL-8 mRNA was observed in human periodontal ligament cells⁴⁶ and in human gingival fibroblasts³⁹ in culture after stimulation with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*, suggesting that products from those periodontal pathogens can trigger an infiltration of several inflammatory cells into the periodontal tissues. In consequence, a strong inflammatory reaction may be elicited at local sites, resulting in the destruction of the periodontal tissues²⁵.

Particular interest has been given in investigating functional polymorphisms in candidate genes for disease association studies. Functional SNPs may cause phenotypic changes by multiple mechanisms, for example, by changing the encoded protein sequence, or by affecting gene regulation, mRNA processing and translation⁴⁵. The SNP (rs4073) in the *IL8* gene has been

considered to be functional because its A allele was previously associated with higher IL-8 production¹⁶. Genetic studies in distinct populations have shown the association between this SNP in the *IL8* gene with inflammatory diseases such as multiple sclerosis, bronchiolitis and asthma^{14,16,18}. It is worth to mention that, the “rs4073” number (reference sequence number from the NCBI's Entrez system)¹⁵ was adopted here for avoiding confusion, since this SNP had received previous different notations like -251 by Hull et al¹⁷ (2001) and -353 by Renzoni³⁰ et al (2000).

To the best of our knowledge, the SNP (rs4073) in the *IL8* gene had never been evaluated in individuals with periodontal disease. Therefore, the aim of this study was to investigate whether this functional SNP in the *IL8* gene is associated with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

MATERIAL AND METHODS

Selection of subjects

This study involved individuals from the State of São Paulo in the Southeastern region of Brazil. A total of 500 subjects were recruited from the patient pool of the School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University - UNESP between November 2004 and May 2007. The present study was approved by the Committee for Ethical Affairs of the São Paulo State University (Protocol number 57/04). All volunteers were informed about the aims and methods of this study, and gave their written consent to participate.

All subjects had to have at least 10 remaining teeth and be in good general health. Exclusion criteria were: need for antibiotic prophylaxis, chronic usage of anti-inflammatory drugs, current pregnancy, ongoing orthodontic therapy and self-declared history of systemic or local disease with influence on the immune system, diabetes mellitus, HIV infection or immunosuppressive chemotherapy.

Diagnosis of periodontitis was established considering the patient medical and dental histories. Each subject was examined by one out of two calibrated periodontists who carried out the periodontal examinations throughout the study period (Weighted kappa= 0.74). The clinical signs and parameters including probing depth (PD), clinical attachment loss (CAL) and bleeding on probe were assessed at six sites around each tooth using a periodontal probe with Williams markings (Trinity- Campo Mourão, Brazil). The subjects were categorized into two groups:

- Control group (GC): subjects exhibiting no sites with CAL and PD \geq 3mm and bleeding on probing.
- Periodontitis group (GP): subjects exhibiting one or more sites with CAL and PD \geq 3 mm and bleeding on probing.

Analysis of genetic polymorphism

Buccal epithelial cells from the subjects were obtained with 3 ml of 3% glucose mouthwash for 2 minutes⁴⁰. DNA was extracted with sequential phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) solution and precipitated with

salt ethanol solution³⁵. In order to genotype individuals to the SNP (rs4073) in the *IL8* gene, a sequence-specific primer polymerase chain reaction (SSP-PCR) was performed as previously described by Renzoni et al.³⁰ (2000), using the following primers: *IL8F*- 5' GTGGAAGTGAATTCTATGTGAA 3', *IL8R* - 5' CACAATTTGGTGAATTATCAAT/A 3', Control *DRB* F - 5' TGCCAAGTGGAGCACCCAA 3' and Control *DRB* R - 5' GCATCTTGCTCTGTGCAGAT 3'. The use of control primers confirmed the PCR amplification, where the *DRB* gene encodes a type of class II protein of from the Major Histocompatibility Complex (MHC).

The reactions in a final volume of 13 μ L was carried out containing: 1x buffer (pH 8.4, 10x solution of 200 mM Tris-HCl and 500 mM KCl - Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil), 0.2 mM of each dNTP (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England), 0.2 μ M of each control primer (Invitrogen, Frederick, MD, USA), 1.5 μ M of each allele-specific primer (Invitrogen, Frederick, MD, USA), 1.5 mM MgCl₂, 0.75 U Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) and 100 ng of genomic DNA. The cycling conditions were as follows: 1 minute at 96°C, 5 cycles of 25 seconds at 96°C, 45 seconds at 70°C, and 25 seconds at 72 °C, 21 cycles of 25 seconds at 96 °C, 50 seconds at 65 °C, and 30 seconds at 72 °C, and 4 cycles of 30 seconds at 96 °C, 60 seconds at 55 °C, and 90 seconds at 72 °C. The PCR-SSP products were analyzed in a 10% polyacrylamide (USB, Cleveland, Ohio, USA) gel electrophoresis stained by rapid silver staining method³³.

Statistical analysis

The illustrative power calculations for periodontitis to estimate the relevance of the p-values produced from this dataset was performed using the methodology for discrete traits in case-control studies²⁸. The parameters considered were similar those used by Brett et al⁴ (2005), including the chronic periodontitis prevalence of 0.06⁷.

The significance of the difference in observed frequencies of the GC and GP groups was assessed by standard chi-squared (χ^2) test, using BioEstat statistical package v 4.0 (UFPA, Belém, Brazil). This software was also used to calculate Hardy-Weinberg expectations. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

The power calculations performed to this study show that the sample size required to ascertain the significance of association of periodontal disease to the studied genetic polymorphisms with an alpha value of 0.001 and power of 95% was 175 individuals. Therefore, the casuistic enrolled in this study was large enough to detect association with an acceptable level of confidence

The Brazilian population investigated here was composed mainly by subjects in a mean age of 39.7 years, females (61.8%), whites (58%) and non-smokers (83%) (Table 1). The casuistic was categorized according to the skin color composition proposed by Peres et al.²⁷ (2007) into whites (predominantly of European heritage), darker-skinned blacks (predominantly African heritage),

lighter-skinned blacks (Admixture between European, African and Amerindian heritages) and yellow skin individuals (Asian descents) (Table 1).

The population effectively genotyped for the SNP (rs4073) comprehends 97.6% of the casuistic. It occurred because methodology difficulties. (Table 2).

The genotypic and allelic frequencies of the SNP (rs4073) in the *IL8* gene were shown in Table 2. The genotype distribution was consistent with the assumption of Hardy-Weinberg equilibrium in both the control and periodontitis groups. No differences were observed in the distribution of alleles and genotypes when comparing the studied groups either overall or when subjects were stratified on the basis of smoking status (Table 2). Although the A allele and the homozygous AA frequencies were higher in the periodontitis group than in the control group in all analyses, the differences in the allele and genotype distributions between the studied groups did not reach statistical significance (Table 2).

DISCUSSION

Periodontitis is a chronic multifactorial disease with a strong genetic component¹⁹. In addition, cytokines play an important role in the coordination and persistence of the inflammatory process that occur in periodontitis²⁵. Several studies have indicated that allelic variations in genes encoding molecules of the host defense system, such as cytokines, could affect the susceptibility to and the severity of periodontal disease^{4,20,34,35,41}. In the last years,

it has been evaluated a potential involvement of polymorphisms in the *IL8* gene in the panel of several inflammatory diseases^{14,29-32}.

The *IL8* gene is located on chromosome 4q13-q21 (Genbank accession M28130) and it is formed by four exons⁸. Polymorphisms in regulatory regions of a gene, mainly in the promoter region, can modify the expression levels of the encoded protein³⁶. The SNP (rs4073) in the promoter region of the *IL8* gene has been correlated with the protein expression, thus it has been considered a functional SNP. The A allele was found related with higher levels of IL-8 production *in vitro* after stimulation with lipopolysaccharide¹⁶. In the last years, the A allele has been associated with higher risk of bronchiolitis, gastric cancer, atrophic gastritis, and distal gastric cancer^{9,13,16,37}.

In spite of the biological relevance of the SNP (rs4073) in the *IL8* gene, our present results did not reveal statistically significant differences in its allelic and genotypic distributions between the control and periodontitis groups. Similar failure of association of this SNP was obtained regarding to other diseases like severe systemic lupus erithematosus, airway disease and vesico-ureteral reflux^{22,23,32}.

Interestingly, some studies have shown lack of or slight disease association when the SNP (rs4073) in the *IL8* gene was analysed alone, but they demonstrated significant association when other closed SNPs were analyzed together, forming haplotypes^{29,32}. This fact occurs when those different SNPs are in linkage disequilibrium, *i.e.*, when some polymorphic loci are physically located on the chromosome leading to be inherited in blocks, without recombination

between parental chromosomes¹¹. Therefore, the analysis of single genetic polymorphisms for the determination of the genetic background might be inadequate to reveal an association with disease while the effect of an individual SNP is not strong enough to show it. The cooperative influence of genetic polymorphisms on disease development should also be considered¹⁹.

Future studies investigating haplotypes formed by three or four SNPs in the *IL8* gene could confirm the association of this gene with susceptibility to periodontitis, mainly for different ethnic populations. It is important to develop investigations in larger and ethnically diverse populations to verify whether a specific polymorphism or haplotypes are a reliable risk marker of periodontitis susceptibility¹⁹.

It has been established that smoking habit is an important risk factor for the initiation and progression of periodontitis^{2,10,21,26}. Kornman et al.²⁰ (1997) have suggested that the smoking related risk could often obscure the polymorphism-related risk. However, in this case, the smoking habit seemed not to be a confounding factor, since the inclusion of smokers (17%) in the total sample did not demonstrated strength to modify the results of the genetic analysis (Table 2).

In this first report investigating a SNP in the *IL8* gene regarding to periodontitis, up to date, it was concluded that the polymorphism (rs4073) in the *IL8* gene was not associated with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Foundation for Research Support of the State of Sao Paulo, Fapesp, grant 2003/10424-0 e 2005/03231-7

REFERENCES

1. Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2002; 29: 177-206.
2. Bergström J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*. 2004 Sep; 92 (1): 1-8.
3. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*. 1993; 64: 456-60.
4. Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F, et al. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res*. 2005; 84 (12): 1149-53
5. Craandijk J, van Krugten MV, Verweij CL, van der Velden U, Loos BG. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002; 29 (1): 28-34.
6. de Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito RB, Line SR. MMP-1 promoter polymorphism: a risk factor for chronic periodontitis severity. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 153-8.
7. Dini EL, Castellanos RA. CPITN: time and cost estimates for periodontal prevention and treatment procedures. *Braz Dent J*. 1995; 6 (1): 53-8.

8. Fey MF, Tobler A. An interleukin-8 (IL-8) cDNA clone identifies a frequent HindIII polymorphism. *Hum Genet.* 1993; 91 (3): 298.
9. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, et al. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer.* 2007; 26 (7): 70.
10. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol.* 1996; 67 (10 Suppl): 1041-9.
11. Gewin B. *Genes IV, USA*, Oxford University Press, 1997. 1260p.
12. Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1 β +3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1998; 25 (10): 781-5
13. Gunter MJ, Canzian F, Landi S, Chanock SJ, Sinha R, Rothman N. Inflammation-related gene polymorphisms and colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15 (6): 1126-31.
14. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114 (3): 671-6.
15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>

16. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax*. 2000; 55: 1023-7.
17. Hull J, Ackerman H, Isles K, Usen S, Pinder M, Thomson A, et al. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am J Hum Genet*. 2001; 69: 413-19.
18. Kamali-Sarvestani E, Nikseresht AR, Aliparasti MR, Vessal M. IL-8 (-251 A/T) and CXCR2 (+1208 C/T) gene polymorphisms and risk of multiple sclerosis in Iranian patients. *Neurosci Lett*. 2006 14; 404 (1-2): 159-62.
19. Kinane DF, Hart TC. Gene and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14 (6): 430-449.
20. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine 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.
21. Kornman KS. Diagnostic and prognostic tests for oral diseases: practical applications. *J Dent Educ*. 2005; 69 (5): 498-508.
22. Kuroda S, Puri P. Lack of association of IL8 gene polymorphisms with familial vesico-ureteral reflux. *Pediatr Surg Int*. 2007; 23 (5): 441-5.
23. Matheson MC, Ellis JA, Raven J, Walters EH, Abramson MJ. Association of IL8, CXCR2 and TNF-alpha polymorphisms and airway disease. *J Hum Genet*. 2006; 51 (3): 196-203.

24. 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.
25. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; .9 (3): 248-66.
26. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl 6): 180-95.
27. Peres MA, Antunes JL, Boing AF, Peres KG, Bastos JL. Skin colour is associated with periodontal disease in Brazilian adults: a population-based oral health survey. *J Clin Periodontol.* 2007; 34 (3): 196-201.
28. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic power calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics.* 2003; 19: 149–150.
29. Puthothu B, Krueger M, Forster J, Heinze J, Weckmann M, Heinzmann A. Interleukin (IL)-18 polymorphism 133C/G is associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26(12):1094-8.
30. Renzoni E, Lympny P, Sestini P, Pantelidis P, Wells A, Black C, et al. Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXC receptor 1 and 2 genes in systemic sclerosis and crytogenic fibrosing alveolitis. *Arthr Rheum.* 2000; 43: 1633-40.

31. Ross OA, O'Neill C, Rea IM, Lynch T, Gosal D, Wallace A, et al. Functional promoter region polymorphism of the proinflammatory chemokine IL-8 gene associates with Parkinson's disease in the Irish. *Hum Immunol.* 2004; 65 (4): 340-6
32. Rovin BH, Lu L, Zhang X. A novel interleukin-8 polymorphism is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis. *Kidney Int.* 2002; 62: 261-5.
33. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994; 17 (5): 914-21.
34. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SR. Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29 (7): 587-91.
35. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SR. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(6): 443-8.
36. Stern DL. The problem of variation. *Nature.* 2000; 408: 529-31.
37. Taguchi A, Ohmiya N, Shirai K, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, et al. Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14 (11): 2487-93.

38. Takigawa M, Takashiba S, Myokai F, Takahashi K, Arai H, Kurihara H, et al. Cytokine-dependent synergistic regulation of interleukin-8 production from human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 1994; 65 (11): 1002-7.
39. Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect Immun.* 1992; 60: 4932-7.
40. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J. Forensic. Odontostomatol.* 2002; 18: 6-9.
41. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 438-42.
42. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol.* 1995; 66(10): 852-9.
43. Van Dyke TE, Vaikuntam J. Neutrophil function and dysfunction in periodontal disease. *Curr Opin Periodontol.* 1994; 19-27.
44. Wagner J, Kaminski WE, Aslanidis C, Moder D, Hiller KA, Christgau M, et al. Prevalence of OPG and IL-1 gene polymorphisms in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007; 34 (10): 823-7.

45. Wang D, Sadée W. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). *AAPS J.* 2006; 18 (8, 3): 515-20.
46. Yamamoto T, Kita M, Oseko F, Nakamura T, Imanishi J, Kanamura N. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with porphyromonas gingivalis. *J Periodontol Res.* 2006; 41 (6): 554-9
47. Yasuda K, Sugita N, Kobayashi T, Yamamoto K, Yoshie H. FcγRIIB gene polymorphisms in Japanese periodontitis patients. *Genes Immun.* 2003; 4 (8): 541-6.

Table 1. Characteristics of the studied populations

	Control (n = 224)	Periodontitis (n = 276)	Total (n = 500)
Age (years)			
Mean (\pm)	35.3 (\pm 10.4)	43.4 (\pm 10.5)	39.7 (\pm 11.2)
Gender n (%)			
Female	134 (59.8)	175 (63.4)	309 (61.8)
Male	90 (40.2)	101 (36.6)	191 (38.2)
Skin Color n (%)			
White	148 (66.0)	142 (51.4)	290 (58.0)
Darker-skinned blacks	25 (11.2)	62 (22.4)	87 (17.4)
Lighter-skinned blacks	45 (20.0)	71 (25.7)	116 (23.2)
Yellow	6 (2.8)	1 (0.5)	7 (1.4)
Smoke habits n (%)			
Non-smokers	204 (91.0)	211 (76.4)	415 (83.0)
Smokers	20 (9.0)	65 (23.6)	85 (17.0)

Table 2. Distribution of alleles and genotypes of the SNP (rs4073) in the studied groups

rs4073	Total n=488			Non-smokers (n=403)		
	Control n(%)	Periodontitis n(%)	p	Control n(%)	Periodontitis n(%)	p
Allele	n=440	n= 536		n=400	n=406	
A	192(43.6)	258(48.1)	0.18	171(42.7)	197(48.5)	0.11
T	248(56.4)	278(51.9)		229(57.3)	209(41.5)	
Genotype	n=220	n= 268		n=200	n=203	
AA	36(16.4)	56(21)	0.32	31(15.5)	43(21.2)	0.21
AT	120(54.5)	146(54.5)		109(54.5)	111(55.5)	
TT	64(29.1)	66(24.5)		60 (30)	49(23.3)	

All *p* values represent chi-squared test results

4.3 Capítulo 3

Association of haplotypes polymorphisms of *IL8* gene promoter with susceptibility to periodontitis

Artigo a ser submetido para publicação

Association of haplotypes polymorphisms of *IL8* gene promoter with susceptibility to periodontitis

Yeon J. Kim, Aline C. Viana, Karen M. C. Curtis, Silvana R. P. Orrico, Joni A. Cirelli, Raquel M. Scarel-Caminaga*

Y. J. Kim, A. C. Viana, S. P. Orrico, J. A. Cirelli - Department of Oral Diagnosis and Surgery;

K. M. C. Curtis, R. M. Scarel-Caminaga – Department of Morphology, School of Dentistry at Araraquara, UNESP- São Paulo State University, SP, Brazil.

*Correspondence: Dr. Raquel M. Scarel-Caminaga. Department of Morphology, School of Dentistry at Araraquara, UNESP- São Paulo State University, CP. 331, CEP 14801-903, Araraquara, SP, Brazil. E-mail: raquel@foar.unesp.br

ABSTRACT

Background: Interleukin 8 (IL-8) is a chemokine related with the initiation and amplification of acute and chronic inflammatory process. Polymorphisms in the *IL8* gene have been associated with inflammatory diseases. Therefore it is an important candidate gene for association studies.

Objective: To investigate whether the –845 (T/C), –738 (T/A) and –353 (A/T) single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *IL8* gene, as well as their

haplotypes would be associated with the susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

Methods: DNA was extracted from buccal epithelial cells of 500 Brazilian individuals (Control n = 224, periodontitis n = 276). The -845 and -738 SNPs were genotyped by the PCR-RFLP method (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism). The -353 SNP were investigated using the Sequence Specific Primers Polymerase Chain Reaction method (SSP-PCR). The data were analyzed by χ^2 test and to estimate the risk to develop periodontitis associated with an allele or genotype, the odds ratio was calculated.

Results: No differences were observed in the allelic and genotypic distribution of all the investigated SNPs between control and periodontitis groups when they were analysed individually. The haplotypes distribution in the periodontitis and controls groups was significantly different both considering the total casuistic or the non-smokers subgroup only. Individuals with the CTA haplotype seemed to be over twice more likely to develop periodontitis than individuals with other haplotypes (*e.g.* OR=2.14, 95% CI =1.36-3.38).

Conclusion: The analysis of haplotypes constructed from -845(T/C), -738(T/A) and -353 (A/T) polymorphisms in the *IL8* gene demonstrated significant association with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

INTRODUCTION

Periodontitis is an inflammatory disease characterized by the loss of connective tissue and alveolar bone. Although the bacterial infection is a primary cause, the progression of disease depends on the production of host mediators in response to bacteria and metabolic products^{27,39}. The host response is influenced by both environmental (*e.g.* smoking, oral hygiene, stress and lifestyle) and genetic factors¹. Studies in twins have indicated that a substantial portion of individual variability of periodontal conditions may be attributable to genetic factors^{24,25}.

It has been observed both increased expression of IL-8 in the affected periodontal tissues^{7,41,42}, and high levels of IL-8 in the crevicular fluid of patients with periodontitis⁴⁴. Considering those findings, we have supposed that the *IL8* gene could be an important candidate gene for periodontitis association studies.

The *IL8* gene is located on chromosome 4q13-q21 (Genbank accession M28130) and consists of four exons⁸. More than 70 SNPs have been identified in the *IL8* gene, some of them have been associated with susceptibility and outcome to several diseases like asthma, nephritis, alveolitis, Parkinson's disease, multiple sclerosis and cancers^{12,21,31,33,35}. The A allele of the -353 SNP in the promoter region of the *IL8* gene was found related to higher levels of IL-8 production *in vitro* after stimulation with lipopolysaccharide and cytokines¹⁷. Despite the potential relevance of polymorphisms in the *IL8* gene in the

inflammatory process, there is no studies evaluating association between *IL8* SNPs and periodontitis. Therefore, the aim of this study was to investigate whether the -845 (T/C), -738 (T/A) and -353 (A/T) SNPs in the *IL8* gene, as well as their haplotypes, would be associated with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

MATERIAL AND METHODS

Selection of subjects

This study involved individuals from the State of São Paulo in the Southeastern region of Brazil. A total of 500 subjects were recruited from the patient pool of the School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University - UNESP, from November 2004 to May 2007. The present study was approved by the Committee for Ethical Affairs of the São Paulo State University (Protocol number 57/04). All volunteers were informed about the aims and methods of this study, and gave their written consent to participate.

All subjects had to have at least 10 remaining teeth and be in good general health. Exclusion criteria were: need for antibiotic prophylaxis, chronic usage of anti-inflammatory drugs, current pregnancy, ongoing orthodontic therapy and self-declared history of systemic or local disease with influence on the immune system, diabetes mellitus, HIV infection or immunosuppressive chemotherapy.

Diagnosis of periodontitis was established considering the patient medical and dental histories. Each subject was examined by one out of two calibrated periodontists who carried out the periodontal examinations throughout the study period (Weighted kappa =0.74). The clinical signs and parameters including probing depth (PD), clinical attachment loss (CAL) and bleeding on probe were assessed at six sites around each tooth using a periodontal probe with Williams markings (Trinity- Campo Mourão, Brazil). The subjects were categorized into two groups:

- Control group (GC): subjects exhibiting no sites with CAL and PD \geq 3mm and bleeding on probing.
- Periodontitis group (GP): subjects exhibiting one or more sites with CAL and PD \geq 3 mm and bleeding on probing.

Analysis of genetic polymorphisms

Buccal epithelial cells from the subjects were obtained with 3 ml of 3% glucose mouthwash for 2 minutes⁴⁰. DNA was extracted with sequential phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) solution and precipitated with salt ethanol solution³⁵

The -845 (T/C) and -738 (T/A) SNPs in the *IL8* gene were investigated using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method³³. The -353 (A/T) polymorphism was analyzed using the sequence specific primers-polymerase chain reaction (SSP-PCR) method³¹. To make the nomenclature of the SNPs clearer, their “rs”

number, reference sequence number from NCBI's Entrez system¹⁵, was included in Table 1, except for the -738 (T/A) SNP, whose “rs” number was not available.

Information concerning the sequences of primers, PCR cycling conditions and genotyping methods related to each investigated SNP are shown in Table 1, while other methodological details and are subsequently described.

- -845 (T/C) and -738 (T/A) SNPs:

PCR reactions in a final volume of 25 μ L was carried out containing 0.5x PCRx Enhancer buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 0.2 mM of each dNTP (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England), 0.2 μ M of each primer (Invitrogen, Frederick, MD, USA), 1.5 mM of MgSO₄, 1.8 U of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil) and 100 ng of genomic DNA. After cycling, 10 μ L of PCR product was digested with the appropriate restriction enzyme (New England – 3 U per reaction) at 37°C overnight.

- SNP -353 (A/T):

The SSP-PCR reactions in a final volume of 13 μ L was carried out containing: 1x buffer (pH 8.4, 10x solution of 200 mM Tris-HCl and 500 mM KCl - Invitrogen, São Paulo, Brazil), 0.2 mM of each dNTP (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England), 0.2 μ M of each control primer (Invitrogen, Frederick, MD, USA), 1.5 μ M of each allele-specific primer (Invitrogen, Frederick, MD, USA), 1.5 mM of MgCl₂, 0.75 U of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil) and 100 ng of genomic DNA.

The PCR-RFLP and SSP-PCR products were analyzed in a 10% polyacrylamide (USB, Cleveland, Ohio, USA) gel electrophoresis stained by rapid silver staining method³⁴. The stained gels were digitally photographed (GDS 8000 System, UVP, Upland, CA, USA) and the images obtained were stored for later analysis.

Statistical analyses

The illustrative power calculations for periodontitis to estimate the relevance of the p-values produced from this dataset was performed using the methodology for discrete traits in case-control studies²⁹. The parameters considered were similar to those used by Brett et al.³ (2005), including the chronic periodontitis prevalence of 0.06⁶.

Differences between the Control and Periodontitis groups of the allelic and genotypic frequencies of each polymorphism in the *IL8* gene were analyzed by standard chi-squared (χ^2) test or by the CLUMP¹⁴ program that employs the Monte Carlo simulations³⁷. The use of the Monte Carlo method³⁷ avoids the need for a Bonferroni correction and the difficulty of assessing the significance of rarer alleles. The CLUMP¹⁴ program is designed for use in genetic case-control studies where multiple alleles are being considered and the observed frequencies of some alleles are rare¹³. The risk associated with individual alleles or genotypes was calculated as the odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI) using the BioEstat software version 4.0 (UFPA, Belém, PA, Brazil). This software was also used to calculate Hardy-Weinberg expectations. Differences

were considered significant when $p < 0.05$. In order to calculate haplotype and linkage disequilibrium the ARLEQUIN³⁸ program was used. Haplotype frequencies were confirmed by direct counting and differences in their distribution between the studied groups were assessed by the CLUMP¹⁴ program

RESULTS

Single nucleotide polymorphism analyses

The power calculations performed to this study show that the sample size required to ascertain the significance of association of periodontal disease to the studied genetic polymorphisms with an alpha value of 0.001 and power of 95% was 175 individuals. Therefore, the casuistic enrolled in this study was large enough to detect association with an acceptable level of confidence.

The casuistic investigated here was composed mainly by female subjects (61.8%), whites (58.0%) and non-smokers (83.0%) (Table 2). The subjects were classified according to the skin color composition as proposed by Peres et al.²⁸ (2007) into: whites (predominantly of European heritage), darker-skinned blacks (predominantly African heritage), lighter-skinned blacks (Admixture between European, African and Amerindian heritages) and yellow skin individuals (Asian descents) (Table 2).

The allelic and genotypic frequencies of investigated SNPs in the *IL8* gene are shown in Table 3. The population effectively genotyped for each SNP was slightly different between each other because methodology difficulties,

mainly for the -845 and -738 SNPs. (Table 3). No differences were observed in the allelic and genotypic distribution of all the investigated SNPs when comparing the studied groups either overall or when subjects were stratified on the basis of smoking status (Table 3). The statistical analysis considering only the Non-smokers subgroup was made to exclude the possible confounding effect of smoking habit. Here, individuals who had never smoked or which are former-smokers for at least five years composed the Non-smokers subgroup.

Only the genotype distribution of the -353 SNP was consistent with the assumption of Hardy-Weinberg equilibrium in the control and periodontitis groups. It was observed strong linkage disequilibria between all pair of the investigated loci, justifying the analyses of polymorphisms as haplotypes.

Haplotype analyses

The analyses of haplotypes were made considering only the subjects who were genotyped for all the three SNPs together. As summarized in Table 4, the distribution of haplotypes arranged as alleles between control periodontitis groups was significantly different considering the total sample ($p=0.006$) and Non-smokers ($p=0.0009$). Interestingly, the haplotype CAT was present only in the periodontitis group. Moreover, it was observed that individuals with the haplotype CTA have 2.14 times more probability to develop periodontitis (Table 4).

The data of haplotypes arranged as genotypes (Table 5) also demonstrated a significant different distribution ($p=0.0009$) between patients and

controls both in the total sample and Non-smokers. In the total sample, we decided to sum the frequencies of haplotypes that demonstrated a difference of four degrees (excluding null percentage) in the haplotypes frequencies to identify higher genetic contrasts between the studied groups. Therefore, it was observed that individuals with the haplotypes TTT/TAT together with TAT/CTA demonstrated twice times more susceptibility to periodontitis than individuals carrying one of all the other haplotypes (OR=2.0; 95% CI=1.27-3.26) (Table 5). Besides, considering the total sample, it could be noted an interesting contrast: the haplotype TAT/CTT, present in 11.4% of the control group was absent in the periodontitis group, while the haplotypes CTT/CTA and TTT/CAT, absent in the control group, were 7.6% frequent in the periodontitis group (p=0.0009).

DISCUSSION

Interleukin 8 (IL-8) is a chemokine related with the initiation and amplification of acute inflammatory reactions and in the chronic inflammatory process⁵. The role of IL-8 in a pathological process of periodontal diseases has been previously investigated. Gingival fibroblasts from patients with periodontitis secrete a higher level of IL-8 than healthy controls⁷. Therefore, an excessive IL-8-mediated function in the inflamed periodontal tissues may contribute to local periodontal tissues destruction²⁶.

In the last years, particular interest has been given to investigating functional polymorphisms in candidate genes for disease association. The

expression levels of a protein may be modulated by genetic polymorphisms in regulatory regions of the gene, mainly in the promoter region⁴⁰. Considering that the A allele of -353 SNP was previously associated with higher IL-8 production¹⁷ and the finding of a significant high level of this protein in the gingival crevicular fluid from patients with periodontitis⁴⁴, it is conceivable hypothesize that the genetically determined different ability of individuals in producing IL-8 may somehow predispose them to the periodontal disease.

Results of the present study revealed that when analysed independently, none of the three SNPs in the promoter region of *IL8* gene could be associated with periodontitis susceptibility (Table 3). On the other hand, when those SNPs were analysed together, as haplotypes, it was found a significant association with susceptibility to periodontitis. Lower association has been previously showed regarding to periodontal disease when one SNP was analysed alone, but when closed SNPs were analyzed as haplotypes, the association with the disease increased, as examples, SNPs in the *IL10* gene and in the vitamin D receptor^{4,36}. Regarding to the *IL8* gene, Puthothu et al.³⁰ (2006) reported no association between bronchial asthma and the -353 SNP alone ($p=0.087$), however the haplotype analysis revealed a positively association ($p=0.036$). Therefore, those cited studies corroborate the idea that haplotypes are more powerful to detect susceptibility alleles than individual polymorphisms and they may give more information basis of disease. This fact can occur when different SNPs are in linkage disequilibrium, *i.e.*, when some polymorphic loci are physically located on the chromosome leading to be inherited in blocks, without

recombination between parental chromosomes¹⁰. In the current study, strong linkage disequilibria were found between all the investigated SNPs both in control and periodontitis groups.

Although we did not find other studies investigating the same SNPs in the *IL8* gene evaluated in the present study, the haplotypes found here were in agreement with those found by Rovin et al.³³ (2002). As an example, haplotype CTA, previously confirmed by sequencing³³, seemed to increase a twice the susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals (Table 4). There are other SNPs in the *IL8* gene in strong linkage disequilibria¹⁸, such as between –353(A/T), +396 (G/T) and +781 (T/C). The majority of association disease studies focusing on polymorphisms in the *IL8* gene have chosen those SNPs^{11,21-23}. A plausible explanation for this fact is the low ethnic variability observed the –845 and –738 SNPs in the *IL8* gene, as well as methodological difficulties for genotyping individuals. Those SNPs, identified by Rovin et al.³³ (2002), are located in the promoter region of the *IL8* gene, which is commonly rich in nucleotides Guanine and Cytosine. This fact is a well-known cause of difficulty in amplifying PCR products. Actually, we just had success in amplifying this fragment of the *IL8* promoter after using a proper PCR cosolvent (PCRx Enhancer buffer -Invitrogen). Furthermore, as mentioned above, the –845 and –738 SNPs in the *IL8* gene demonstrated low ethnic variability, since the mutant alleles, respectively C and A, are common only in African American 13%¹⁶ or 5%³³, and absent in European and Asian individuals^{16,33}. This fact might explain the failure

of Hardy-Weinberg equilibrium of the genotype distribution of those SNPs in our study.

It has been established that smoking habits is an important risk factor for the initiation and progression of Periodontitis^{2,9,20}. Kornman et al.¹⁹ (1997) have suggested that the smoking-related risk could often obscure the polymorphism-related risk. However, in this case, the smoking habits was not a confounding factor, since the inclusion of smokers in the total sample did not have strength to modify the results of genetic analysis.

Previous findings and our data may contribute with future investigations of the etiology and pathogenesis of periodontitis. Increasing knowledge about genetic factors that predispose individuals to periodontal disease will facilitate both the disease prediction and prevention of high-risk individuals.

It was concluded, for the first time to our knowledge, which the haplotypes formed by the -845 (T/C), -738 (T/A) and -353 (A/T) polymorphisms in the *IL8* gene were associated with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Foundation for Research Support of the State of Sao Paulo, Fapesp, grant 2003/10424-0 e 2005/03231-7

REFERENCES

1. Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2002; 29: 177-206.
2. Bergström J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*. 2004; 92 (1): 1-8.
3. Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F, et al. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res*. 2005; 84 (12): 1149-53.
4. Brito Júnior RB, Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, de Souza AP, Barros SP. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene are associated with periodontal disease. *J Periodontol*. 2004; 75 (8): 1090-5.
5. Campa D, Hung RJ, Mates D, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al. Lack of association between -251 T>A polymorphism of IL8 and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14 (10): 2457-8.
6. Dini EL, Castellanos RA. CPITN: time and cost estimates for periodontal prevention and treatment procedures. *Braz Dent J*. 1995; 6 (1): 53-8.
7. Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. *J Periodontol*. 1998; 69 (8): 899-910.
8. Fey MF, Tobler A. An interleukin-8 (IL-8) cDNA clone identifies a frequent HindIII polymorphism. *Hum Genet*. 1993; 91 (3): 298.
9. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*. 1996; 67 (10 Suppl): 1041-9.

10. Gewin B. *Genes IV*, USA, Oxford University Press, 1997. 1260p.
11. Gunter MJ, Canzian F, Landi S, Chanock SJ, Sinha R, Rothman N. Inflammation-related gene polymorphisms and colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15 (6): 1126-31.
12. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114 (3): 671-6.
13. Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalised early onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 430– 436.
14. <http://www.mds.qmw.ac.uk/statgen/dcurtis/software.html>
15. [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)
16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=2227532
17. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax.* 2000; 55: 1023-7.
18. Hull J, Ackerman H, Isles K, Usen S, Pinder M, Thomson A, et al. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am J Hum Genet.* 2001; 69: 413-19.
19. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine 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.

20. Kornman KS. Diagnostic and prognostic tests for oral diseases: practical applications. *J Dent Educ.* 2005; 69 (5): 498-508.
21. Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, Guino E, Navarro M, de Oca J, et al. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFkB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer Res.* 2003; 63 (13): 3560-6.
22. Matheson MC, Ellis JA, Raven J, Walters EH, Abramson MJ. Association of IL8, CXCR2 and TNF-alpha polymorphisms and airway disease. *J Hum Genet.* 2006; 51 (3): 196-203.
23. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res.* 2002; .62: 3369-72.
24. Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL et al. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol.* 1991; 62: 293-9.
25. Michalowicz BS. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol.* 1994; 65 (5 Suppl): 479-88.
26. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; .9 (3): 248-66.
27. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1991; 26 (3 Pt 2): 230-42.

28. Peres MA, Antunes JL, Boing AF, Peres KG, Bastos JL. Skin colour is associated with periodontal disease in Brazilian adults: a population-based oral health survey. *J Clin Periodontol*. 2007; 34 (3): 196-201.
29. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic power calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics*. 2003; 19: 149–150.
30. Puthothu B, Krueger M, Forster J, Heinze J, Weckmann M, Heinzmann A. Interleukin (IL)-18 polymorphism 133C/G is associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2007; 26 (12): 1094-8.
31. Renzoni E, Lympany P, Sestini P, Pantelidis P, Wells A, Black C, et al. Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXC receptor 1 and 2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Arthr Rheum*. 2000; 43: 1633-40.
32. Ross OA, O'Neill C, Rea IM, Lynch T, Gosal D, Wallace A, et al. Functional promoter region polymorphism of the proinflammatory chemokine IL-8 gene associates with Parkinson's disease in the Irish. *Hum Immunol*. 2004; 65 (4): 340-6
33. Rovin BH, Lu L, Zhang X. A novel interleukin-8 polymorphism is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis. *Kidney Int*. 2002; 62: 261-5.

34. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 1994; 17 (5): 914-21.
35. Savage SA, Abnet CC, Mark SD, Qiao YL, Dong ZW, Dawsey SM, et al. Variants of the IL8 and IL8RB genes and risk for gastric cardia adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004; 13 (12) :2251-7
36. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SR.. Interleukin 10 gene promoter polymorphism are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(6): 443-8.
37. Sham, P. C. & Curtis, D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Annals of Human Genetics*. 1995; 59:97– 105.
38. Schneider S, Roessli D, Excoffier L. ARLEQUIN ver. 2000: A Software for Population Genetics Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva: Switzerland; 2000.
39. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Duff GW. Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2000; 27 (11): 810-8.
40. Stern DL. The problem of variation. *Nature*. 2000; 408: 529-31.
41. Takigawa M, Takashiba S, Myokai F, Takahashi K, Arai H, Kurihara H, et al. Cytokine-dependent synergistic regulation of interleukin-8 production from human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 1994; 65 (11): 1002-7

42. Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect Immun.* 1992; 60: 4932-7.
43. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol.* 2002; 18 (1): .6-9.
44. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol.* 1995; 66 (10): 852-9.

Table 1 – Sequences of primers, PCR cycling conditions and genotyping methods information related to each investigated SNP

SNP (rs number)	Primer sequences, PCR cycling conditions and genotyping method	Reference
-845 (T/C) (rs2227532)	F - GAATTCAGTAACCCAGGCAT R – AAGCTTGTGTGCTCTGCTGTC 95° C, 3,2 min; 95°C, 45 sec; 56°C, 30sec; 68°C, 2 min - 35 cycles; 68°C, 8 min. RFLP by using <i>Ase I</i> restriction enzyme digestion	Rovin et al. (2002)
-738 (T/A)*	F - GAATTCAGTAACCCAGGCAT R – AAGCTTGTGTGCTCTGCTGTC 95° C, 3,2 min; 95°C, 45 sec; 56°C, 30 sec; 68°C, 2 min – 35cycles; 68°C, 8 min. RFLP by using <i>Xba I</i> restriction enzyme digestion	Rovin et al. (2002)
-353 (A/T) (rs4073)	F- GTG GAACTGATTTCTATGTGAA R - CACAATTTGGTGAATTATCAAT/A 96°C, 1 min; 96°C, 25 sec; 70°C, 45 sec, 72°C, 25 sec - 5 cycles; 96°C, 25 sec; 65°C, 50 sec; 72°C, 30 sec – 21 cycles; 96°C, 30 sec; 55°C, 60 sec; 72°C, 90 sec – 4 cycles. PCR-SSP using the control primers: <i>DRB</i> F - TGCCAAGTGGAGCACCCAA <i>DRB</i> R- GCATCTTGCTCTGTGCAGAT	Renzoni et al. (2000)

* It was not found a rs (reference sequence) identification number related to this SNP.

Table 2. Characteristics of the studied populations

	Control (n = 224)	Periodontitis (n = 276)	Total (n = 500)
Age (years)			
Mean (\pm)	35.3 (\pm 10.4)	43.4 (\pm 10.5)	39.7 (\pm 11.2)
Gender n (%)			
Female	134 (59.8)	175 (63.4)	309 (61.8)
Male	90 (40.2)	101 (36.6)	191 (38.2)
Skin Color n (%)			
White	148 (66.0)	142 (51.4)	290 (58.0)
Darker-skinned blacks	25(11.2)	62 (22.4)	87 (17.4)
Lighter-skinned blacks	45 (20.0)	71 (25.7)	116 (23.2)
Yellow	6 (2.8)	1 (0.5)	7 (1.4)
Smoke habits n (%)			
Non-smokers	204 (91.0)	211 (76.4)	415 (83.0)
Smokers	20 (9.0)	65 (23.6)	85 (17.0)

Table 3 - Distribution of alleles and genotypes of the -845(T/C), -738(T/A) and -353 (T/A) polymorphisms in the *IL8* in the studied groups

SNP	Total			Non-smokers		
	GC(%)	GP(%)	p	GC(%)	GP(%)	p
-845						
Allele	n=358	n=436		n=336	n=336	
T	303 (84.6)	354 (81.2)	0.236	287(85.4)	269(80)	0.17
C	55 (15.4)	82 (18.8)		49(14.6)	67(20)	
Genotype	n=182	n=218		n=168	n=168	
TT	127 (69.8)	137 (62.8)	0.247	119(70.8)	102(60.795)	0.10
TC	55 (30.2)	80 (36.795)		49(29.2)	65(39.2)	
CC	0	1 (0.005)		0	1(0.005)	
-738						
Allele	n=364	n=435		n=216	n=260	
T	240 (66)	276 (63.4)	0.51	139(64.3)	172(66)	0.75
A	124 (34)	159 (36.6)		77(35.7)	88(34)	
Genotype	n=182	n=217		n=169	n=166	
TT	59 (32.4)	61 (28,1)	0.60	56(33)	49(29.5)	0.47
AT	122 (67)	154 (70.9)		113(67)	116(70.494)	
AA	1(0.6)	2 (1)		0	1(0.006)	
-353						
Allele	n=440	n= 536		n=400	n=406	
A	192 (43.6)	258 (48.1)	0.18	171(42.7)	197(48.5)	0.11
T	248 (56.4)	278 (51.9)		229(57.3)	209(41.5)	
Genotype	n=220	n= 268		n=200	n=203	
AA	36 (16.4)	56(21)	0.32	31(15.5)	43(21.2)	0.21
AT	120 (54.5)	146 (54.5)		109(54.5)	111(55.5)	
TT	64 (29.1)	66(24.5)		60 (30)	49(23.3)	

All *p* values represent chi-squared test results

Table 4 - Distribution of *IL8* locus haplotypes found in the studied groups

Haplotypes -845 -738 -353	Total		p	Non-smokers		p
	GC n=356	GP n=420		GC n=334	GP n=322	
T T T	85(24.0)	101(24.0)		82(24.5)	80(25.1)	
T T A	98(27.5)	105(25.0)		92(27.5)	51(15.8)	
T A T	106(29.8)	111(26.4)		98(29.4)	82(25.4)	
T A A	14(3.9)	25(6.0)	0.006*	14(4.2)	46(14.2)	0.0009*
C T T	21(5.8)	3(0.7)		20(6.0)	1(0.3)	
C T A	32(9.0)	60(14.3)		28(8.4)	50(15.5)	
C A T	0	15(3.6)		0	12(3.7)	
Haplotype			p			p
CTA	32	60	0.0012	20	50	0.0001
Others	314	360		314	272	
OR	2.14	95% CI =1.36-3.38		2.88	95% CI =1.67-4.96	

p values marked by an asterisk (*) were obtained by the T4 values of computer program CLUMP and *p* values not marked were calculated by X^2 test.

Table 5. Distribution of *IL8* haplotypes (arranged as genotypes) found in the studied groups

Genotypes -845 -738 -353/ -845 -738 -353	Total			Non-smokers		
	GC	GP	p	CG	CPG	p
T T T/ T T T	18(10.1)	9(4.3)		17(10.1)	8(5.0)	
T T T/ T T A	25(14)	24(11.4)		24(14.3)	18(11.2)	
T T A/ T T A	6(3.4)	8(3.8)		5(3.0)	6(3.7)	
T T T/ T A T	15(6.7)	31(14.7)		15(9.0)	24(15)	
T T A/ T A T	50(28.8)	39(18.6)		47(28.1)	27(16.7)	
T T A/ T A A	10(5.6)	21(10)		10(6.0)	16(10)	
T A T/ T A T	1(0.6)	1(0.5)		1(0.6)	0	
T T T/ C T T	2(1.2)	2(1.0)	0.0009*	2(1.2)	0	0.0009*
T T T/ C T A	7(4)	11(5.2)		7(4.2)	10(6.2)	
T T A/ C T A	1(0.6)	5(2.4)		1(0.6)	5(3.1)	
T A T/ C T T	19(11.4)	0		18(10.7)	0	
T A T/ C T A	20(11.2)	39(18.6)		16(9.6)	31(19.2)	
T A A/ C T A	4(2.4)	4(1.9)		4(2.4)	3(1.8)	
C T T/ C T A	0	1(0.5)		0	1(0.6)	
T T T/ C A T	0	15(7.1)		0	12(7.4)	
Genotypes**			0.004			0.002
T T T/ T A T	35	70		31	55	
T A T/ C T A	143	140		136	106	
Others	2.0	95% CI=1.27-3.26		OR=2.27	95% CI=1.36-3.78	

p values marked by an asterisk (*) were obtained by the T4 values of computer program CLUMP and *p* values not marked were calculated by X^2 test.

** The genotypes included were those that demonstrated a difference of four levels in the frequency between Control and PD groups excluding genotypes with empty table cells (*versus* the sum of the other genotypes frequencies).

5 DISCUSSÃO

O sistema imune inato tem papel importante na iniciação, progressão e retenção do processo inflamatório. Consequentemente variações genéticas que possam alterar componentes deste sistema podem explicar as diferenças individuais na resposta à inflamação e ao tratamento clínico⁶⁹.

Portanto, há um grande interesse em estudar polimorfismos de base única (SNPs) em genes que codificam moléculas envolvidas na cascata inflamatória. Estes poderiam ser utilizados potencialmente como marcadores para suscetibilidade, severidade e/ou tratamento clínico de doenças inflamatórias^{27,69}.

O papel da IL-8 foi previamente associado com a patogênese de várias formas de periodontite^{3,13,16}. Estudos demonstraram que fibroblastos gengivais de pacientes com periodontite secretam mais IL-8 do que indivíduos saudáveis¹¹. Além disso, maior nível de IL-8 foi detectado no fluido crevicular gengival e tecido gengival de pacientes com periodontite^{13,17,75}. Assim, resposta imune excessiva mediada por IL-8 no tecido inflamado pode contribuir para destruição dos tecidos periodontais⁴³.

Neste estudo investigou-se a possibilidade de associação dos SNPs -353(A/T), -738(T/A) e -845(T/C) no promotor do gene *IL8*, com a suscetibilidade à periodontite. O gene que codifica a IL-8 situa-se no locus 4q12-q21 e consiste em 4 exons^{12,39,42}. Interesse particular tem sido manifestado por pesquisadores em averiguar se polimorfismos em genes candidatos a doenças que são investigados em estudos de associação têm um papel funcional.

Polimorfismos funcionais são aqueles que causam alterações no fenótipo por vários mecanismos, por exemplo, alterando a seqüência da proteína correspondente ou afetando a expressão do gene, seja por processamento do RNAm ou pela taxa de sua tradução em proteína⁷⁸. O nível de uma proteína pode ser modulado por polimorfismos presentes na região regulatória do gene, principalmente no promotor, o qual pode influenciar a taxa de transcrição do gene⁶⁷. Um polimorfismo na base -353 (promotor) do gene *IL8* mostrou regular a expressão da proteína. O alelo A foi associado a maior produção da quimiocina, in vitro, após estimulação por lipopolissacarídeos bacterianos e o alelo T, principalmente em homozigose, mostrou-se baixo produtor da IL-8²³. A análise do genótipo de indivíduos com bronquiolite viral e seus pais mostrou uma associação do alelo -353A com o grau severo da doença²⁴. Esse mesmo polimorfismo também está associado aos níveis aumentados de *Prostate-Specific Antigen* medidos antes da remoção de tumores na próstata, representando um fator de risco para esse tipo de câncer, provavelmente pela influência da IL-8 na angiogênese³⁵.

Outros polimorfismos foram identificados no promotor do gene *IL8*, como o -845 (T/C) e o -738 (T/A), tendo sido o alelo -845C associado a formas mais severas de nefrite em indivíduos afro-americanos com lúpus eritematoso sistêmico⁴⁹. Como esses polimorfismos estão muito próximos do SNP -353(A/T), os três polimorfismos apresentam-se em desequilíbrio de ligação, tendo sido o haplótipo -845C/-738T/-353A confirmado por sequenciamento⁴⁹. Investigando a alveolite fibrosante, foram identificados dois polimorfismos no intron 1 do gene *IL8*: +293 (G/T) e + 678 (T/C), e também no promotor -353

(A/T), os quais foram genotipados por meio de reações de SSP-PCR⁴⁷. Observou-se que esses loci polimórficos no intron e o locus -353 no promotor do gene *IL8* estavam em desequilíbrio de ligação⁴⁷. É interessante que em outro estudo, foi confirmada a ligação dos loci -353 e +678, de forma de o haplótipo -353A/+678T mostrou-se associado com suscetibilidade a bronquiolite²⁴.

Os resultados do presente estudo não demonstraram diferenças estatisticamente significantes na distribuição da frequência alélica e genotípica dos SNPs independentemente, entre grupo controle e grupo periodontite, na população total ou em não fumantes. A análise realizada somente em indivíduos não fumantes excluiu a possibilidade da influência do fator fumo neste estudo. Apesar de relevância biológica do SNP -353(A/T), estudos prévios também têm reportado falta de associação deste com doenças como lupus eritematoso sistêmico, doenças das vias respiratórias e refluxo vesico-ureteral^{28,34,49}.

Considerando que todos os SNPs investigados neste estudo apresentaram-se em desequilíbrio de ligação em ambos os grupos, justifica-se analisá-los como haplótipos. Deve-se salientar que para tal análise incluíram-se somente os indivíduos para os quais foi possível realizar a genotipagem dos três loci. As frequências dos haplótipos como alelos ou genótipos entre os grupos apresentaram diferenças significantes na população total e não fumante. Especialmente, o haplótipo CAT, que foi confirmado previamente por seqüenciamento⁴⁹, foi observado somente nos indivíduos com periodontite. Os indivíduos com haplótipo CTA apresentaram-se mais susceptíveis à periodontite (OR= 2,14 95%CI= 1,36-3,38). Considerando os haplótipos como genótipos, foi

observado na população total um contraste interessante: o haplótipo TAT/CTT presente em no grupo controle não foi encontrado no grupo periodontite, enquanto CTT/CTA e TTT/CAT só foram observados no grupo periodontite. Notou-se que os indivíduos com haplótipos TTT/TAT ou TAT/CTA apresentaram o dobro de susceptibilidade à periodontite em comparação àqueles que portaram outros haplótipos (OR= 2,0 95% CI =1,27-3,26).

Os resultados deste estudo mostraram que, quando analisados independentemente, os SNPs na região promotora do gene *IL8* não foram associados com periodontite. No entanto, foi observada associação significativa com a doença quando estes SNPs foram analisados em conjunto, formando haplótipos. Este fato pode ocorrer quando diferentes polimorfismos encontram-se em desequilíbrio de ligação, ou seja, quando os alelos nesses loci são herdados em blocos, sem recombinação entre os cromossomos paterno e materno. Estes resultados estão de acordo com a literatura, como nos estudos de associação do gene *IL10* e do receptor de vitamina D^{6,55}. Em relação ao gene *IL8*, Puthothu et al.⁴⁶ (2006) demonstrou falta de associação do SNP -353 (sozinho) com asma brônquica (p=0.087), porém, a análise dele em associação com outros SNPs próximos (como haplótipo) revelou associação positiva (p=0.036).

Outros SNPs no gene *IL8*, como o +396 (G/T) e +781 (T/C), também estão em forte desequilíbrio de ligação com o SNP -353 (A/T)⁴⁷. Estes três loci têm sido os escolhidos para serem investigados na maioria dos estudos de associação com doenças^{21,24,34,35,46-49}. A explicação mais plausível para este fato é a baixa variabilidade étnica observada nos SNPs -845 e -738, associada à

dificuldade metodológica para a genotipagem destes loci. Os SNPs -845 e -738, identificados por Rovin et al.⁴⁹ (2002), foram genotipados por meio da PCR-RFLP, onde era amplificado um fragmento longo (1527 pb) da região promotora do gene *IL8*, que a seguir era digerido por enzimas de restrição. Esse método, seguido por nós, mostrou grande dificuldade de amplificação para a maioria das amostras de DNA. Tanto que, para não abandonar o projeto de genotipar os sujeitos participantes desta pesquisa para esses loci, várias modificações na reação da PCR foram necessárias para obter-se sucesso na amplificação. Assim, das informações sobre as condições da PCR descritas por Rovin et al.⁴⁹ (2002), utilizou-se neste estudo somente os *primers*. É natural encontrar dificuldade na amplificação de regiões promotoras por estas serem ricas em nucleotídeos Citosina e Guanina (regiões GC). Portanto, como já mencionado, esta pode ser uma das explicações para a maioria dos estudos de associação não ter contemplado tais SNPs em sua investigação. A baixa variabilidade étnica observada nos SNPs -845 e -738 pôde ser confirmada neste estudo com uma população brasileira, pois a distribuição dos genótipos deles não demonstrou equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. Geneticistas verificaram que o alelo mutante de cada locus, respectivamente, C e A, foram mais comuns somente em indivíduos negros localizados nos Estados Unidos 13%* ou 5%⁴⁹, mostrando-se ausentes em indivíduos Europeus e Asiáticos*.

É pertinente considerar aqui a importância de estudar a frequência dos polimorfismos genéticos da IL-8 na população brasileira, pois tais dados são fundamentais para o desenvolvimento de futuros projetos que objetivem

Reference SNP (ref SNP) Cluster Report: rs 2227532 (population diversity). [Acesso em 2007/11/07] Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=2227532

investigar a relação desses polimorfismos em outras patologias. Entende-se que estudos que buscam marcadores genéticos de suscetibilidade ou severidade da doença periodontal, além de propiciarem um conhecimento mais aprofundado da doença, podem contribuir para que o tratamento da peridontite se torne mais individualizado de acordo com as características genéticas do paciente, portanto, mais eficiente. Acredita-se que as informações obtidas deste estudo enfocando polimorfismos no gene *IL8* com relação à doença periodontal poderão ser úteis também para futuras pesquisas com outras doenças inflamatórias, onde o papel biológico desempenhado pela IL-8 seja semelhante.

CONCLUSÃO

De acordo com o objetivo proposto e os resultados obtidos foram inferidas as seguintes conclusões:

1. Não foi verificada associação dos polimorfismos -845(T/C), -738 (T/A) e -353(A/T) do gene *IL8* com a suscetibilidade a periodontite quando analisados individualmente.
2. Quando os mesmos polimorfismos foram analisados em conjunto, foi observada associação de haplótipos com a suscetibilidade a periodontite na população brasileira estudada.

7 REFERÊNCIAS*

1. Astolfi CM, Shinohara AL, da Silva RA, Santos MC, Line SR, 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: 699-703.
2. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest.* 1989; 84: 1045-9.
3. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol.* 1993; 64: 456-60.
4. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Porphyromonas gingivalis-induced inflammatory mediator profile in an ex vivo human whole blood model. *Clin Exp Immunol.* 2006; 143: 50-7.
5. Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F, et al. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2005; 84: 1149-53
6. de Brito Júnior RB, Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, de Souza AP, Barros SP. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene are associated with periodontal disease. *J Periodontol.* 2004; 75: 1090-5.
7. Camp RD, Fincham NJ, Ross JS, Bacon KB, Geraing AJ. Leukocyte chemoattractant cytokines of the epidermis. *J Invest Dermatol.* 1990; 95 (Suppl 6): 108-10.

* De acordo com o estilo Vancouver.

Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/unoiform_requirements.html

8. Corey LA, Nance WE, Hofstede P, Schenkein HA. Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. *J Periodontol.* 1993; 64: 1205-8.
9. Dini EL, Castellanos RA. CPITN: time and cost estimates for periodontal prevention and treatment procedures. *Braz Dent J.* 1995; 6: 53-8.
10. Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. *J Periodontol.* 1998; 69: 899-910.
11. Engebretson SP, Lamster IB, Herrera-Abreu M, Celenti RS, Timms JM, Chaudhary AG, et al. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 1999; 70: 567-73.
12. Fey MF, Tobler A. An interleukin-8 (IL-8) cDNA clone identifies a frequent HindIII polymorphism. *Hum Genet.* 1993; 91: 298.
13. Fitzgerald JE, Kreutzer DL. Localization of interleukin-8 in human gingival tissues. *Oral Microbiol Immunol.* 1995; 10: 297-303.
14. Flemming T. Periodontitis. *Ann Periodontol.* 1994; 4: 32-7.
15. Fukusaki T, Ohara N, Hara Y, Yoshimura A, Yoshiura K. Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population. *J Periodontal Res.* 2007; 42 :541-5.

16. Gainet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidaló MA, Elbim C. Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Lab Invest.* 1998; 78: 755-62.
17. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol.* 2000; 71: 1535-45.
18. Garlet GP, Martins WJr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodont Res.* 2003; 38: 210-7.
19. Gemmell E, Seymour GJ. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodontol.* 1994; 28-38.
20. Gore, EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1 β +3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1998; 35: 781-5.
21. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114: 671-6.
22. Hodge, P. J., Riggio, M. P. & Kinane, D. F. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalised early onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 430– 4

23. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax*. 2000; 55: 1023-7.
24. Hull J, Ackerman H, Isles K, Usen S, Pinder M, Thomson A, et al. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am J Hum Genet*. 2001; 69: 413-9.
25. Johnson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. *J Dent Educ*. 2001; 65: 313-21.
26. Kinane DF, Hart TC. Gene and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14: 430-49.
27. Kornman DF, Crane A, Wang HY, Di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997; 24: 72-7.
28. Kuroda S, Puri P. Lack of association of IL8 gene polymorphisms with familial vesico-ureteral reflux. *Pediatr Surg Int*. 2007; 23: 441-5.
29. Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedashi M, Nozaki T, et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with porphyromonas gingivalis via toll-like receptor 2. *J Periodontol*. 2004; 75: 370-9.
30. Leonard EJ, Yoshimura T. neutrophil attractant/activation protein-1(NAP-1(interleukin-8)). *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990; 2:479-86.

31. Linden GJ, Mullally BH, Freeman R. Stress and the progression of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 675-80.
32. Loos BG, John RP, Laine ML. identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl 6): 159-79.
33. Marazita ML, Burmeister JA, Gunsolley JC, Koertge TE, Lake K, Schenkein HA. Evidence for autosomal dominant inheritance and race specific heterogeneity in early - onset periodontitis. *J Periodontol.* 1994; 65:623-30.
34. Matheson MC, Ellis JA, Raven J, Walters EH, Abramson MJ. Association of IL8, CXCR2 and TNF-alpha polymorphisms and airway disease. *J Hum Genet.* 2006; 51: 196-203.
35. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res.* 2002; 62: 3369-72.
36. McGee JM, Tucci MA, Edmundson TP, Serio CL, Johnson RB. The relationship between concentrations of proinflammatory cytokines within gingiva and the adjacent sulcular depth. *J Periodontol.* 1998; 69: 865-71.
37. Mealey BL. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. *Compend Contin Educ Dent.* 2000; 21: 943-6.
38. 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; 7: 1699-707.

39. Modi WS, Dean M, Seuanex HN, Mukaida N, Matsushima K, O'Brien SJ. Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/ IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily. *Hum Genet.* 1990; 84: 185-7.
40. 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: 23-30.
41. Moreira PR, de Sá AR, Xavier GM, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, et al. A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res.* 2005; 40: 306-11.
42. Mukaida N, Shiroo M, Matsushima K.. Genomic structure of the human Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol.* 1989; 143: 1366-71.
43. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9: 248-66.
44. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A Taq I polymorphism in the human Interleukin-1 beta (IL-1 β) gene correlates with secretions in vitro. *Eur J Clin Invest.* 1992; 22: 396-402.
45. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic power calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics.* 2003; 19: 149–50.

-
46. Puthothu B, Krueger M, Forster J, Heinze J, Weckmann M, Heinzmann A. Interleukin (IL)-18 polymorphism 133C/G is associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26 :1094-8.
 47. Renzoni E, Lympny P, Sestini P, Pantelidis P, Wells A, Black C, et al. Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXC receptor 1 and 2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Arthr Rheum.* 2000; 43: 1633-40.
 48. Ross OA, O'Neill C, Rea IM, Lynch T, Gosal D, Wallace A, et al. Functional promoter region polymorphism of the proinflammatory chemokine IL-8 gene associates with Parkinson's disease in the Irish. *Hum Immunol.* 2004; 65: 340-6
 49. Rovin BH, Lu L, Zhang X. A novel interleukin-8 polymorphism is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis. *Kidney Int.* 2002; 62: 261-5.
 50. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl 6): 108-29.
 51. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual.*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
 52. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994; 17: 914-21.

53. Scarel RM. Análise de polimorfismo no gene MSX1 em indivíduos com agenesia dental [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da UNICAMP; 2000.
54. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SR. Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 587-91.
55. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SR. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 443-8.
56. Schneider S, Roessli D, Excoffier L. ARLEQUIN 2000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. Switzerland: University of Geneva; 2000.
57. Schroder JM, Christophers E. Identification of C5ades arg and an anionic neutrophil-activating peptide (ANAP) in psoriatic scales. *J Invest Dermatol.* 1986; 87: 53-8.
58. Seitz M, Dewald B, Gerber N, Baggiolini M. Enhanced production of neutrophil-activating peptide 1/ Interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1991; 87: 463-9.
59. Sham PC, Curtis D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet.* 1995; 59: 97– 105.
60. Shapira L, Borinski R, Sela MN, Soskolne A. Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 44-8.

61. Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res.* 2000; 79: 1864-9.
62. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 134-44.
63. de Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito RB, Line SR. MMP-1 promoter polymorphism: a risk factor for chronic periodontitis severity. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 153-8.
64. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostack L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 548-54.
65. Stern DL. The problem of variation. *Nature.* 2000; 408: 529-31.
66. Suzuki A, Ji G, Numabe Y, Muramatsu M, Gomi K, Kanazashi M, et al. Single Nucleotide polymorphisms associated with aggressive periodontitis and severe chronic periodontitis in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 317:887-92.
67. Takashiba S, Takigawa M, Takahashi K, Myokai F, Nishimura F, Chihara T, et al. Interleukin-8 is a major neutrophil chemotactic factor derived from cultured human gingival fibroblast stimulated with interleukin-1 β or tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun.* 1992; 60: 5253-8.
68. Takashiba S, Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol 2000.* 2006; 40: 94-106.

-
69. Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect Immun*. 1992; 60:4932-7.
 70. Tonetti MS, Mombelli A. Early onset periodontitis. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry*. Copenhagen: Munksgaard; 1996. p. 227-57.
 71. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2002; 18: 6-9.
 72. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 438-42.
 73. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol*. 1995; 66: 852-9.
 74. Van Dyke TE, Vaikuntam J. Neutrophil function and dysfunction in periodontal disease. *Curr Opin Periodontol*. 1994; 23: 19-27.
 75. Wagner J, Kaminski WE, Aslanidis C, Moder D, Hiller KA, Christgau M, et al. Prevalence of OPG and IL-1 gene polymorphisms in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007; 34: 823-7.

76. Wang D, Sadée W. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). *AAPS J.* 2006; 188: 515-20.
77. Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontol Res.* 1996; 31: 393-407.
78. Yamamoto T, Kita M, Oseko F, Nakamura T, Imanishi J, Kanamura N. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with porphyromonas gingivalis. *J Periodontol Res.* 2006; 41: 554-9

Anexos



ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu, (nome: _____) (nacionalidade) _____ portador do RG nº _____ residente à _____ na cidade de _____ Estado de _____ concordo voluntariamente em participar da pesquisa "Análise do Gene Interleucina 8 e seus Receptores em Indivíduos com Doença Periodontal Crônica" e declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

1. Foi esclarecido que a referida pesquisa tem por objetivo estudar se a carga genética da pesteira (que foi herdada dos pais) influencia na inflamação, sangramento e dor na gengiva (Doença Periodontal Crônica). Para isso, passarei por um exame clínico odontológico de rotina e serei convidado a bochechar um líquido à base de apiclar por 2 minutos. Permito que esse bochecho seja coletado para o desenvolvimento da pesquisa. Sei que não sofrerei em fazer o bochecho e que não há nenhum risco para mim.
2. Foi esclarecido que, se for necessário fazer alguma cirurgia para tratar meu problema de gengiva ou dos dentes, ou tiver que retirar algum dente para meu tratamento, serei convidado a doar um pedacinho minúsculo de gengiva para desenvolvimento da pesquisa acima citada. Como esse pedacinho de gengiva seria jogado fora, ele não fará falta para meu restabelecimento e cicatrização da cirurgia.
3. Foi esclarecido que as amostras obtidas das coletas serão congeladas e posteriormente estudadas em laboratório, e que a realização da pesquisa não implica em riscos para mim, pois serão utilizados materiais descartáveis e instrumentais estéreis. Com relação aos benefícios, além de ser encaminhado para tratamento estarei contribuindo espontaneamente para a comunidade científica e para a população de uma forma geral, para que a Doença Periodontal Crônica seja melhor compreendida. Receberei orientação de correta escovação dental.
4. Estou ciente que possuo plena liberdade para resistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização.
5. Estou ciente que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras, porém, será mantido a todo instante o sigilo de minha identidade, assegurando minha privacidade.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, _____ de _____ de 2004.

Telefone do Pesquisador ¹
Responsável
(16) 3301-6504

Telefone do Comitê de Ética
em Pesquisa - FQAr
(16) 3301-6492/6434

Assinatura do paciente ou Responsável:


Professora Responsável

Profª Dra Raquel Mantuaren Scalet Caminada

Protocolo CEP nº 57/04

Aprovado em Reunião de

05/10/04

Secretaria de CEP - FQAr

ANEXO 3

Laboratório de Genética e Biologia Molecular N° _____
Seleção de Pacientes para Pesquisa envolvendo Polimorfismos e Doença Periodontal
QUESTIONÁRIO

Nome: _____
Data de Nascimento: _____ Idade: _____ Sexo: M F
Naturalidade: _____
Residência: _____ N°: _____
Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____
Telefone: (____) _____ Profissão: _____ Telefone: (____) _____
Local de Trabalho: _____

Etnia: Caucasiano Negro Mulato Pardo Asiático

Ascendência (pais): _____

Ascendência (avós): _____

Grupo Controle: Pacientes periodonto saudáveis, o gengivite

Grupo Doença Periodontal: Pelo menos 2 dentes distintos com PS e NI \geq 3mm + SS

- Toma algum medicamento? _____ Qual? _____
Frequência? _____
- Tem osteoporose? _____
- Tem algum problema respiratório? (ex: asma) _____
- Tem alergia? _____ De quê? _____
- Tem problema cardíaco? _____
- Tem artrite? _____
- Tem alguma outra doença? _____ Qual? _____
- Já fez Tratamento Periodontal? _____ Onde e há quanto tempo? _____
- Fumo: sim não
 - Fumante _____ / dia Há quanto tempo? _____
 - Ex-fumante _____ / dia Há tempo parou? _____ Durante quanto tempo? _____

Somente Mulheres:

- Toma anticoncepcional? _____ Qual? _____
- Faz reposição hormonal? _____
- Esta na menopausa? _____

EXAME CLÍNICO:

Diagnóstico	Sextantes					
	1	2	3	4	5	6
Gengivite						
1 dente PS e NI \geq 3 mm +SS						
2 dentes PS e NI \geq 3 mm +SS						
3 dentes PS e NI \geq 3 mm +SS						
TOTAL DE DENTES						

Exame clínico periodontal feito por: _____

Entrevista e coleta feita por: _____

Araraquara, _____ de _____ de 200__

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 20 de março de 2008. (data da defesa)

YEON JUNG KIM