



**Universidade Estadual
Paulista
Faculdade de Odontologia de
Araraquara**



Aline Cavalcanti Viana

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE DO
RECEPTOR 2 DA INTERLEUCINA 8 EM INDIVÍDUOS COM
PERIODONTITE**

Araraquara

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Aline Cavalcanti Viana

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE DO
RECEPTOR 2 DA INTERLEUCINA 8 EM INDIVÍDUOS COM
PERIODONTITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de MESTRE em Periodontia.

Orientadora:

Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Araraquara

2008

ALINE CAVALCANTI VIANA

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE DO
RECEPTOR 2 DA INTERLEUCINA 8 EM INDIVÍDUOS COM
PERIODONTITE**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

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

2º Examinador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

3º Examinador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Araraquara, 24 de março de 2008.

DADOS CURRICULARES

Aline Cavalcanti Viana

NASCIMENTO	4 de junho de 1981 – Salvador/BA
FILIAÇÃO	Hernani Velloso Viana Filho Silvia Regina Cavalcanti Viana
1999/2003	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia – UFBA
2005/2007	Especialização em Periodontia APCD - Araraquara
2006/2008	Pós-Graduação em Periodontia - Nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Aos meus pais Hernani e Silvia

Vocês são os eternos orientadores da minha formação pessoal e profissional! Obrigada por todo amor, compreensão e incentivo, não medindo esforços em todas as etapas da minha vida! Por enxergarem muito antes este momento e por acreditarem e confiarem em mim!

Amo vocês!!!

À minha irmã Gabriela

Por sempre estar ao meu lado, por escutar meus desabafos dos momentos difíceis, sempre trazendo uma palavra de ânimo. Obrigada também pela ajuda na arte gráfica da dissertação e durante todo o processo do mestrado.

Aos meus avós Elpídio e Regina

Hernani (“in memorian”) e Almira

Vocês sempre foram um exemplo de vida para mim, conseguindo superar os obstáculos e chegando ao final com muito sucesso. Vó Regina obrigada por todas as orações!!!

Aos meus tios e primos

Mesmo com a distância, vocês estiveram presentes em todas as
minhas conquistas, torcendo muito e fazendo a minha vida
mais feliz!!!

Obrigada pelas orações, pelo carinho e pelo apoio...

Agradecimentos Especiais

A Deus

Por ter me iluminado sempre, me mostrando os sinais para o caminho correto.

Obrigada pela força e pela perseverança.

À minha amiga Yeon

Dupla! Parceira! Por se mostrar sempre tão leal e tão firme. Obrigada pela convivência, por compartilhar e dividir cada momento seja ele ruim ou bom. Você fez parte de todos os meus passos em Araraquara, desde o estágio na faculdade, a especialização na APCD , e o mestrado, e tudo isso só fortaleceu nossa amizade. Obrigada pelas conversas, pelo apoio e pelo carinho! Você foi fundamental na minha caminhada até aqui!

À minha orientadora

Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Pela atenção, confiança e disponibilidade! Obrigada pela contribuição com o meu crescimento científico, acadêmico e pessoal!

Agradeço a dedicação como orientadora e pela maneira compreensiva com a qual sempre me atendeu!

Às amigas Fer Lessa, Lícia, Márcia, Fer Bello, Andreza e Alliny

Por todo o carinho sempre recebido, pelo apoio nos momentos de crise e principalmente, por trazerem alegria para minha vida e tornarem a minha estadia em Araraquara mais feliz.

Às amigas Dora, Alice, Martina, Paloma, Carol e Clara

Apesar da distância vocês mostraram-se sempre presentes, cheias de atenção e carinho. Nossa amizade me deu muita força para enfrentar os obstáculos e seguir em frente. Obrigada pelo apoio constante!

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp**, na pessoa de sua Diretora, **Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio** e Vice-Diretor, **Dr. José Cláudio Martins Segala**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

À Coordenadora do Curso de Pós- Graduação- área de Periodontia **Dra. Silvana Perez Orrico**, pelo empenho e respeito que conduz suas atividades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - **Fapesp** e ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- **CAPES** pelo apoio financeiro.

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia e de outras que se dedicaram às disciplinas durante o curso de Doutorado:

Dr. Benedito Egbert Corrêa de Toledo, Dr. Carlos Rossa Junior, Dra. Elaine Maria Sgavioli

Massucato, Dr. Elcio Marcantonio Junior, Dra. Glória Maria Thompson Galli, Dr. Joni Augusto Cirelli, Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Dr. Luís Carlos Spolidorio, Dra. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli,

Dra. Mirian Aparecida Onofre, Dr. Maurício Tatsuei Sakima, Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio, Dra. Silvana Regina Perez Orrico. Pela excelente formação e extrema competência, pela disponibilidade e convivência tanto nas salas de aula quanto nos corredores e por contribuírem de maneira especial com a minha formação profissional.

**Ao Departamento de Odontologia Social, Disciplina de Clínica Integrada,
especialmente ao Prof. Maurício Nagle,**

Pelo apoio nas triagens, passo fundamental na seleção da casuística.

Aos Profs. Joni e Silvana,

Pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Élcio Marcantonio Júnior,

Pela forma positiva como me recebeu, pelos ensinamentos pessoais e profissionais recebidos e principalmente, por me ouvir sempre que precisei.

Ào Dr. Sandro Valentini e a Veridiana Cano,

Por ceder seu espaço no Laboratório do Departamento de Ciências Biológicas e pela ajuda para realização do sequenciamento.

Ao grupo do laboratório de Genética Molecular, especialmente à Karen e Rivelto,

Por toda ajuda e paciência no desenvolvimento da parte experimental! Obrigada, vocês foram fundamentais!!!

Ao Prof. Silvio Govone,

Por toda atenção e paciência, e pela ajuda com a estatística.

Aos meus amigos de turma de Mestrado: **Yeon, Roberta, Naná, Rubens, Romeu, Rodrigo, Wagner, Andrés, Marina e Sabrina** pela convivência harmoniosa, pela amizade sincera, pelo apoio e carinho. A nossa turma foi especial!!!

Aos amigos da Pós-graduação:

Rafael Sartori, Rafael Faeda, Dani Zandim, Maurício, Débora, Denise,

Rafaela, Fábio, Dani Spirandelli, Eduardo Ishi, Fernanda Bello,

Andréa, Fernando, Juliana Morais, Juliana Rico, Patrícia,

Vanessa, Ana Emília, Ivy

o convívio com cada

um de vocês me fez uma pessoa mais feliz!

Aos meus amigos especiais: **Fábio, Ana Emília, Jú Morais, Fernando, Prof. Zé**

Eduardo,

Obrigada pelo carinho e pela atenção! A convivência com vocês me fortaleceu muito!

À amiga **Beatriz Lopes e à D. Cidália**, que me receberam em Araraquara, no momento em que mais precisava. Obrigada por me receber com tanto carinho, mesmo ainda quando nos conhecíamos tão pouco. Obrigada pela disponibilidade e pelo apoio que sempre me dedicaram em todas as fases de nossa convivência!

Aos funcionários e amigos da Disciplina de Periodontia e do Laboratório de Microbiologia, especialmente: **Carina, Cláudia, Maria do Rosário, Maria José, Regina Lúcia e Teresinha** pelo imenso carinho durante a nossa convivência, pela dedicação, paciência e atenção com os pacientes e principalmente pelos sorrisos!

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação: **Mara, Rosângela, José Alexandre e Flávia**, pela gentileza com que sempre me receberam, paciência, competência e por resolverem tantas dúvidas!

A todos os funcionários desta faculdade, em especial aos funcionários da Biblioteca **Maria Helena, Marley, Eliane, Odete, Adriano, Eliane, Maria Inês, Silvia Helena e Ceres**, pela atenção e excelente revisão bibliográfica.

Aos **pacientes** que colaboraram com a pesquisa, disponibilizando seus tempos para coletas e análises e que com carinho compreenderam meu desafio e dividiram esta responsabilidade comigo!

Epígrafe

“Quando achamos que já encontramos todas as respostas, vem a Vida e muda todas as perguntas.”

Luís Fernando Veríssimo

Sumário

Resumo	17
Abstract	19
1 Introdução	22
2 Proposição	34
3 Material e Método	36
3.1 Cálculo da amostra.....	36
3.2 Seleção da amostra.....	36
3.3 Análise de polimorfismos genéticos	38
3.3.1 Obtenção de DNA.....	38
3.3.2 Investigação dos Polimorfismos no gene <i>CXCR2</i>	39
3.3.2.1 Polimorfismo na base +785(C/T):.....	39
3.3.2.2 Polimorfismo na base +1208 C/T:	41
3.3.2.3 Polimorfismo na base +1440 G/A:.....	42
3.4 Análise Estatística dos Resultados	47
4 Capítulos	49
4.1 Capítulo 1	49
4.2 Capítulo 2.....	59
5 Considerações Finais	87
6 Conclusão	93
7 Referências	95

8 Anexos	109
8.1 Aprovação do Comitê de Ética	109
8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	110
8.3 Ficha Clínica	111

Viana AC. Investigação de polimorfismos no gene do receptor 2 da interleucina 8 em indivíduos com periodontite [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

RESUMO

Objetivo: O presente estudo foi realizado para investigar a associação entre polimorfismos +785(C/T), +1208(T/C) e +1440(G/A) no gene do receptor 2 da interleucina 8 (*CXCR2*), bem como de seus haplótipos, e a suscetibilidade à Periodontite em indivíduos brasileiros. **Material e Método:** Foram selecionados 500 indivíduos de ambos os gêneros (Grupo Controle: n = 224, idade média 35,3 anos; Grupo Periodontite [GP] n = 276, idade média 43,4 anos) que procuraram atendimento na Faculdade de Odontologia de Araraquara. A partir de células da mucosa bucal, o DNA foi extraído por uma solução de solventes orgânicos (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico; - 25:24:1). Os polimorfismos +785 e +1208 foram investigados pela técnica *SSP-PCR* (*Sequence Specific Primer – PCR*) enquanto que o polimorfismo +1440 foi analisado por *PCR-RFLP* (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*). Os fragmentos obtidos por *PCR-RFLP* e os produtos obtidos por *SSP-PCR* foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 10% (locus +785 e +1208) e 14% (locus +1440), sendo depois corados com nitrato de prata. **Resultados:** Considerando a frequência

de alelos e genótipos de cada polimorfismo isoladamente, não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos. Quando analisados em haplótipos, a frequência do haplótipo TCG foi significativamente maior no Grupo Periodontite ($p=0,005$; odds ratio [OR] = 3,54) do que no Controle. O haplótipo heterozigoto TCG/CCA foi relacionado com um aumento de suscetibilidade à periodontite na população total ($p=0,015$; OR=3,22). **Conclusão:** Os resultados deste estudo sugerem que haplótipos no gene *CXCR2* estão associados com suscetibilidade à periodontite em indivíduos Brasileiros.

Palavras-chave: Polimorfismo genético; periodontite; receptores da interleucina-8B; haplotipos.

Viana AC. Investigation of polymorphisms in the interleukin 8 receptor 2 gene in individuals with periodontitis [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

ABSTRACT

Objective: This study investigated whether the +785(C/T), +1208(T/C) and +1440(G/A) single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CXCR2* gene, as well as their haplotypes, would be associated with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals. **Methods:** Five hundred individuals in both genders (Control Group [CG] = 224, mean age 35.3 years; Periodontitis Group [PG] = 276, mean age 43.4 years) were recruited for this study from the patient pool of the School of Dentistry of Araraquara – FOAr/UNESP. DNA was extracted from buccal epithelial cells with a solution of organic solvents (phenol/chloroform/isoamyl alcohol, - 25:24:1). The +785 and +1208 SNPs were investigated using the Sequence Specific Primers Polymerase Chain Reaction method (SSP-PCR). The +1440 SNP was genotyped by the PCR-RFLP method (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism). The SSP-PCR products and the RFLP fragments were submitted to polyacrylamide gel electrophoresis in a concentration of 10% and 14%, respectively, which were stained by silver staining method. **Results:** Considering each polymorphism allele and genotype frequency isolated, no differences were found

between groups. The frequency of TCG haplotype was significantly higher in the Periodontitis group ($p=0.005$, odds ratio [OR] =3.54) than in the Controls. The heterozygous haplotype TCG/CCA was related to an increased susceptibility to Periodontitis in the total casuistic ($p=0.015$, OR=3.22). **Conclusion:** These data indicate that haplotypes in the *CXCR2* gene were associated with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

Keywords: Periodontitis; genetic polymorphism; interleukin-8B receptor; haplotypes.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Periodontite é uma doença infecciosa caracterizada por um processo inflamatório destrutivo que afeta os tecidos de suporte e proteção do dente. Pode ocorrer formação de bolsas periodontais, recessões gengivais, reabsorção do osso alveolar, e eventual perda do dente²⁰. Histologicamente, a Periodontite é caracterizada por acúmulo de células inflamatórias na porção extravascular do tecido conjuntivo gengival. Numerosas espécies bacterianas têm sido isoladas da placa subgengival, sendo algumas estreitamente relacionadas ao início e progressão da doença. Devido à maioria das bactérias periodontopatogênicas residirem nas bolsas periodontais, o sistema imune apresenta dificuldade em eliminar os microrganismos. Essa situação particular leva a uma inflamação crônica e a uma contínua resposta exacerbada do hospedeiro, resultando em destruição do tecido. A resposta local do hospedeiro contra essas bactérias é o recrutamento de leucócitos e subsequente liberação de mediadores inflamatórios⁶⁰.

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. As bactérias associadas à periodontite 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 tecidual⁸⁶. Assim, tanto bactérias com potencial patogênico quanto a qualidade da resposta do hospedeiro parecem constituir duas faces da etiologia da periodontite.

Dados recentes têm demonstrado que a periodontite está amplamente distribuída em todo o mundo, inclusive no Brasil^{18,25,83}. Além disso, nos últimos anos, a periodontite tem sido reconhecida como sendo de caráter multifatorial⁶⁸; sofrendo influência do fumo³⁵, estresse psicossocial⁴⁷ e doenças sistêmicas como diabetes⁵⁰. Confirmando a relação de fatores genéticos com a periodontite, um estudo em gêmeos revelou que estes fatores são responsáveis por cerca de 50% da expressão da doença⁵².

A comunidade científica internacional tem apresentado um grande interesse em investigar o papel que determinados mediadores desempenham em doenças inflamatórias. Desses mediadores, o grupo das citocinas merece especial atenção. As citocinas constituem um grupo diverso de pequenas proteínas e glicoproteínas que apresentam um vasto patamar de funções biológicas potentes. A maioria das citocinas tem sido agrupada de acordo com a função a elas atribuídas em seis grupos: interleucinas, citocinas citotóxicas, fatores estimulantes de colônia, interferons, fatores de crescimento e quimiocinas⁹¹. 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 uma diminuição na produção apropriada de citocinas antiinflamatórias, e uma falha no equilíbrio destas situações parece ocorrer na periodontite²³.

Diferenças individuais nos níveis de interleucina relacionados aos diferentes graus de suscetibilidade à periodontite podem ser atribuídas, entre outros fatores, a polimorfismos nos genes de citocinas e de seus receptores. Como exemplo, a frequência do alelo 2 do polimorfismo *IL1B* ⁺³⁹⁵³ está aumentada em pacientes com doença periodontal avançada²⁶. Indivíduos homocigotos para o alelo 2 desse locus polimórfico, presente no exon 5, produzem a proteína IL1-β em um nível quatro vezes mais elevado⁶³. Os níveis de expressão de uma proteína também podem ser modulados por polimorfismos genéticos em uma região regulatória do gene chamada “promotor”⁸². Na região promotora existem motivos (seqüências curtas de DNA) específicos que, ligados a fatores de transcrição, aumentam ou reprimem a transcrição da proteína⁸². Foi observada associação da severidade ou suscetibilidade à periodontite com polimorfismos no promotor dos genes *IL2*⁷⁴, *IL6*⁸⁸ e metaloproteinase 1 (*MMP1*)¹⁵. Investigando o gene *IL10*, dois polimorfismos na região promotora foram associados com a periodontite, sendo que determinados haplótipos formados por tais polimorfismos aumentaram a suscetibilidade à doença em até 8 vezes⁷⁶.

O envolvimento de citocinas, bem como de seus polimorfismos genéticos, têm sido cada vez mais investigados em doenças inflamatórias,

respiratórias, e também na periodontite. Por exemplo, tanto os níveis protéicos quanto polimorfismos em seus respectivos genes como *IL2*, *IL4*, *IL10* e *TGFB* foram estudados na periodontite^{16,74-76}, e em indivíduos com asma^{32,33,92}. Vários polimorfismos genéticos em genes como *IL1A*, *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *VDR* (receptor de vitamina D), *TLR4* (receptor semelhante a *Toll* - 4) e *TNFA* (fator de necrose tumoral - alfa) foram avaliados na doença periodontal crônica e também na periodontite agressiva⁹. No entanto, o conhecimento que se obteve desses estudos mostrou que há necessidade de mais pesquisas na área, para confirmar os resultados obtidos, o que deverá ser feito com populações etnicamente diferentes e com um número amostral maior³⁹. Além disso, é importante investigar polimorfismos, não somente em genes de citocinas, mas também em outras moléculas importantes nas doenças inflamatórias.

As quimiocinas são um tipo especial de citocinas quimiotáticas que 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 angiogênese¹. A IL-8 é uma quimiocina produzida principalmente por fagócitos mononucleares do sangue, mas também por células endoteliais, epiteliais, sinoviais, fibroblastos, condrócitos e tumorais^{4, 45}. A IL-8 tem importante 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. A resposta dos neutrófilos à IL-8 é caracterizada por migração de células, liberação de enzimas

(como elastase) contidas nos grânulos de secreção presentes no citoplasma, e outras alterações intra e extracelulares. 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 ativação⁷.

As atividades celulares da IL-8 são mediadas por dois receptores, CXCR-1 (anteriormente chamado IL8R- α) e CXCR-2 (anteriormente chamado IL8R- β , OMIM⁴⁹ 146928) que são codificados por dois genes localizados no braço longo do cromossomo 2 (2q34-q35)⁵⁵.

Os receptores de quimiocinas pertencem à superfamília da rodopsina que são acoplados à proteína G e que têm sua estrutura composta por sete domínios transmembrana α -helicoidais⁸¹ (Figura 1)¹. O termo “CXC” advém da estrutura protéica da quimiocina, onde dois resíduos de cisteína amino terminais que participam da ponte dissulfeto estão separados por um outro aminoácido¹. Devido aos receptores de quimiocinas serem específicos a uma subclasse de quimiocinas, o sistema de nomenclatura dos receptores utiliza o termo CXC e acrescenta a letra “R” (receptor), seguido do número^{56,96}.

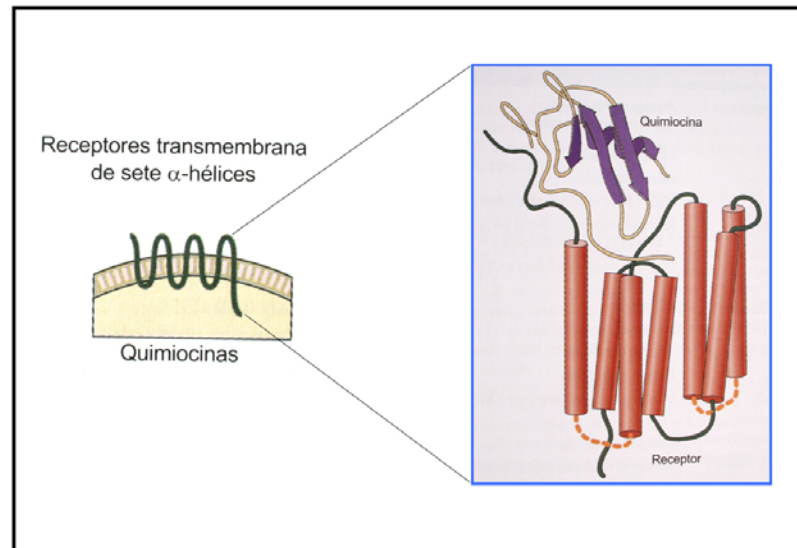


FIGURA 1- Desenho esquemático mostrando o receptor de quimiocina sobre a superfície do neutrófilo. À direita, uma representação mais evidenciada do modelo da estrutura helicoidal do receptor e sua interação com a quimiocina correspondente. Os sete domínios α -hélice transmembrana do receptor são representadas como cilindros (Adaptado de Abbas et al.¹, 2003).

Os receptores CXCR-1 e CXCR-2 são expressos sobre os neutrófilos, têm 77% da seqüência de aminoácidos em comum⁵⁸ e ligam-se a IL-8 com similar afinidade⁴⁴. Contudo, enquanto o CXCR-1 liga-se somente a IL-8, o CXCR-2 liga-se também com alta afinidade a outras quimiocinas CXC como o oncogene relacionado ao crescimento (*growth-related oncogene* – *GRO- α* , *GRO- β* e *GRO- γ*)⁸¹, ao peptídeo ativador de neutrófilos 2⁶⁵ e a quimiocinas CXC que contenham a seqüência amino terminal Glu-Leu-Arg (ELR) em comum⁵⁷. Funções distintas dos receptores CXCR-1

e CXCR-2 podem ser advindas de diferenças na seqüência de aminoácidos de seus domínios terminais NH₂ e COOH, por exemplo, a ativação da fosfolipase D e a produção de superóxidos via NADPH oxidase estão relacionadas somente ao CXCR-1³⁷.

A interação da IL-8 com seus receptores leva a uma mudança na forma do neutrófilo e influencia o comportamento da célula como no processo de excitose, *up-regulation* de moléculas de adesão e outros receptores, formação de lipídios bioativos e liberação de intermediários reativos do oxigênio⁹⁵.

A importância dos receptores da IL-8 para a migração dos neutrófilos foi demonstrada em um estudo com camundongos *knockout* para receptores homólogos do CXCR-1 e CXCR-2, ou seja, que não expressam tais proteínas. Nestes animais, os neutrófilos falharam em atravessar o epitélio e em acumular-se no tecido subepitelial³¹. Níveis baixos de expressão do CXCR-2 foram relacionados à maior suscetibilidade à infecções do trato genito-urinário em mulheres na pré-menopausa⁸⁰. Além disso, uma superexpressão do CXCR-2 foi considerada como um importante fator em doenças inflamatórias como artrite reumatóide, aterosclerose e psoríase^{41,53}.

Como já está bem estabelecido que polimorfismos em um dado gene podem influenciar na expressão da respectiva proteína, com relação ao gene *CXCR2*, localizado no 2q35 (número acesso GenBank M99412), ao longo de seus 3 exons⁸¹, há alguns polimorfismos que têm sido bastante investigados em estudos de associação com doenças^{11,48,65}. Entre eles, os três mais investigados são: o polimorfismo +785(C/T) localizado no exon 3 (mas que não altera a seqüência de

aminoácidos da proteína), e os polimorfismos +1208(T/C) e + 1440(G/A) que estão localizados na região 3' não-traduzida do mesmo exon⁶⁵. Polimorfismos na região 3' não-traduzida têm a capacidade de alterar o processamento de RNAm, sua estabilidade, e tradução^{2,81}.

O polimorfismo +1208(T/C) do gene *CXCR2* foi investigado como fator de suscetibilidade para o desenvolvimento de esclerose múltipla em indivíduos iranianos, mas não foi encontrada nenhuma associação significativa³⁸. Quando avaliados em relação à doença de Behçet, os polimorfismos +785(C/T) e +1208(T/C) também não apresentaram nenhuma associação positiva^{19,43}. Resultado semelhante foi obtido por Breunis et al.¹⁰, onde não foi encontrada relação dos polimorfismos +1208(T/C) e +1440(G/A) com a Doença de Kawasaki. Cabe esclarecer que crianças que sofrem desta doença apresentam níveis bastante elevados de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como IL-8⁴⁶.

No entanto, em relação a doenças como a alveolite fibrosante associada à esclerose sistêmica, polimorfismos no gene *CXCR2* parecem ser importantes, pois foi observado um aumento significativo na frequência de indivíduos com genótipos +785CC e +1208TT em um grupo com essa patologia⁶⁵. Quando o polimorfismo +785(C/T) foi avaliado em doenças respiratórias, a presença do alelo T foi considerada como um possível fator protetor contra inflamações pulmonares⁴⁸. Um efeito protetor semelhante foi observado em relação aos polimorfismos +1208(T/C) e +1440(G/A), sendo que a presença do diplótipo 1208T/1440G

representou uma diminuição do risco de desenvolvimento do Sarcoma de Kaposi Clássico (*Odds Ratio*=0,49; intervalo de confiança de 95%: 0,30-0,78)¹¹.

IL-8 e seus Receptores na Periodontite

Devido às propriedades quimioatrativas para neutrófilos, a IL-8 tem um papel importante na patogênese da periodontite. 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. Indivíduos que sofrem de doenças sistêmicas caracterizadas em parte por disfunção de neutrófilos, como síndrome de Chediak-Higashi e deficiência de adesão de leucócitos, apresentam severidade na destruição periodontal. Assim, apesar da ação de neutrófilos ser uma barreira inicial contra bactérias periodontopatogênicas, a contínua e excessiva presença de IL-8 pode contribuir para a destruição local dos tecidos periodontais⁶⁰. 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 cultura⁸⁵, em células do ligamento periodontal in vitro⁹³, além de estimular maior secreção da proteína pelas células do epitélio gengival⁴² e pelos leucócitos⁸. A produção de IL-8 é estimulada por IL1- α e TNF- α , que são expressos no periodonto inflamado⁸⁴.

Camundongos *knockout* para *CXCR2* submetidos a periodontite experimental por *Porphyromonas gingivalis* foram altamente suscetíveis à perda

óssea alveolar⁹⁴. Em humanos, foi observada maior tendência na expressão de IL-8 e do receptor CXCR-1 em indivíduos com periodontite crônica e agressiva quando comparados a indivíduos sem doença²². Técnicas de imunohistoquímica e imunocitoquímica detectaram a presença de IL-8 e seus receptores CXCR-1 e CXCR-2 no epitélio gengival in vivo e in vitro⁷⁸. Foi claramente observado que o epitélio gengival expressou ambos CXCR-1 e CXCR-2, mas que a expressão de CXCR-2 foi maior em células endoteliais de microvasos e células musculares lisas da microvasculatura gengival (MVEC)⁷⁸. Resultado semelhante foi obtido por Richards et al.⁶⁷ que reportou que em tecidos orais a expressão de CXCR-2 (em MVEC) foi duas vezes maior que CXCR-1. A observação feita por Sfakianakis et al.⁷⁸ da maior expressão de CXCR-2 em sítios mais distantes do local da inflamação, recebeu a seguinte explicação baseada no papel biológico desta constante no estudo de Chuntharapai, Kim¹⁴: a secreção de IL-8 no sítio da inflamação difunde-se pelo tecido até alcançar vasos sanguíneos mais distantes; então CXCR-2 recebe o sinal e inicia a migração dos neutrófilos até o sítio inflamado. Isso acontece porque, a IL-8, mesmo em menor quantidade em sítios mais distantes do foco da inflamação, tem duas a cinco vezes mais afinidade por CXCR-2 que por CXCR-1. Conforme os neutrófilos aproximam-se do sítio inflamado, CXCR-1 torna-se o receptor dominante na mediação do sinal da IL-8 pois ele apresenta rápida re-expressão, enquanto que CXCR-2, não. A observação feita por Chuntharapai, Kim¹⁴ da maior afinidade de IL-8 por CXCR-2 está de acordo com Murphy, Tiffany⁵⁸, mas contraria o estudo de Lee

et al.⁴⁴ que detectou níveis altamente semelhantes da afinidade de IL-8 pelos dois receptores.

Apesar da importância biológica da IL-8 e seus receptores, e da constatação de que polimorfismos genéticos podem alterar a taxa de transcrição protéica tornando indivíduos mais suscetíveis à doenças inflamatórias, até o momento não encontramos nenhum estudo investigando polimorfismos nesses genes em indivíduos com Periodontite.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi investigar os polimorfismos +785(C/T) , +1208(T/C) e +1440(G/A) no gene *CXCR2* (receptor 2 da IL-8) na busca de associação dos mesmos, bem como de seus haplótipos, com a suscetibilidade à Periodontite em indivíduos brasileiros.

Material e método

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Cálculo da amostra

Foi utilizado o programa *Genetic Power Calculator*⁶⁴, 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 utilizados aqui foram semelhantes aos de Brett et al.⁹, tendo sido considerada a prevalência de 0,06 de periodontite crônica¹⁷.

A análise do poder do estudo demonstrou que o tamanho da casuística necessária para comprovar associação entre a periodontite e os polimorfismos genéticos seria de 175 indivíduos em cada grupo, com um valor alfa de 0,001 e um poder de 95%. Portanto, a casuística envolvida neste estudo foi grande o suficiente para detectar associação com um nível de confiança aceitável.

3.2 Seleção da amostra

Foi constituída por 500 indivíduos que buscaram atendimento odontológico na Faculdade de Odontologia de Araraquara –UNESP entre novembro de 2004 e maio de 2007. Participaram indivíduos acima de 23 anos, de ambos os gêneros, de qualquer grupo étnico-racial e com pelo menos 10 dentes na cavidade bucal. Indivíduos com história de diabetes, infecção por HIV, com pré-medicação antibiótica recente ou uso crônico de drogas antiinflamatórias e pacientes grávidas ou

em lactação não foram incluídos. Todos os indivíduos que aceitaram participar desta pesquisa foram informados sobre os propósitos do estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (CEP FOAr - UNESP 57/04), e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Inicialmente foi realizada a anamnese com a finalidade de avaliar a história médica e odontológica de cada indivíduo, seguida do exame clínico periodontal. Os exames clínicos periodontais foram realizados por dois examinadores, previamente calibrados (Kappa ponderado = 0.74)¹², com a utilização da sonda periodontal (sonda tipo Williams - Trinity® – Campo Mourão, Paraná, Brazil). Os parâmetros clínicos de profundidade de sondagem e nível de inserção clínica (NIC) foram examinados em seis sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual) de cada dente, além de sangramento à sondagem.

Após o exame periodontal, os indivíduos foram classificados em dois diferentes grupos:

- Grupo Periodontite (n = 276): indivíduos que apresentaram um ou mais sítios com profundidade de sondagem e perda de inserção ≥ 3 mm e sangramento à sondagem.

- Grupo Controle (n = 224): indivíduos que não apresentaram sítios com perda de inserção e profundidade de sondagem ≥ 3 mm e sangramento à sondagem.

3.3 Análise de polimorfismos genéticos

3.3.1 Obtenção de DNA

O material biológico escolhido para posteriormente extrair-se dele o DNA, foram células epiteliais da mucosa bucal obtidas por meio de um bochecho com solução de glicose a 3%, por 2 minutos⁷³. O tubo contendo o bochecho foi centrifugado a 2.000 rpm durante 20 minutos. 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%), sendo depois transferido para um microtubo de 1,5 ml e armazenado a -20°C para posterior extração do DNA⁸⁷. O DNA foi extraído com o método do fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), seguido de precipitação com acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e etanol. Após o DNA ser ressuspenso com água livre de DNAsas e RNAsas (*Invitrogen*) o mesmo foi quantificado com o auxílio de um espectrofotômetro (*Biophotometer, Eppendorf*) sendo a pureza estimada pela razão OD 260/280⁶⁹. Após o procedimento de extração as amostras foram diluídas para a concentração de 100 ng/ μ L e armazenadas sob a temperatura de -20°C.

3.3.2 Investigação dos Polimorfismos no gene *CXCR2*

O polimorfismo +1440(G/A) na região 3' não traduzida do exon 3 do gene *CXCR2* foi investigado por meio da *PCR-RFLP*, sendo que tal estratégia para esse locus foi desenvolvida pelo presente grupo de pesquisa⁸⁹. Os outros dois polimorfismos no gene *CXCR2*, o +785(C/T) e +1208(T/C) foram investigados pela metodologia do *SSP-PCR* (*Sequence Specific Primer – PCR*)⁶⁵.

Outra nomenclatura que também pode ser usada para polimorfismos é o número de referência sequencial encontrado no NCBI's Entrez system⁵⁹. No caso específico destes três polimorfismos no gene *CXCR2* os números são: +785 (refSNP ID: rs2230054), +1208 (refSNP ID: rs1126579) e +1440 (refSNP ID: rs1126580).

3.3.2.1 Polimorfismo na base +785(C/T)

A genotipagem desse polimorfismo foi realizada por meio da técnica do *SSP-PCR* utilizando os seguintes *primers*:

<i>CXCR2 785 C Forward</i>	CGT CCT CAT CTT CCT GCT C	170 pb
<i>CXCR2 785 T Forward</i>	CGT CCT CAT CTT CCT GCT T	
<i>CXCR2 785 Reverse</i>	GGA GTC CAT GGC GAA ACT TC	
Controle <i>DRB Forward</i>	TGC CAA GTG GAG CAC CCA A	796 pb
Controle <i>DRB Reverse</i>	GCA TCT TGC TCT GTG CAG AT	

pb= pares de bases

Nesta técnica, para cada indivíduo a ser genotipado são realizadas duas reações da *PCR*. Em uma reação é utilizado o *primer forward* cuja seqüência termina com a base C (citosina), que combinado com o *primer reverse* permite a amplificação da seqüência, caso o indivíduo tenha o alelo C. A outra reação utiliza o *primer forward* cuja seqüência termina com a base T (timina), que combinado com o *primer reverse* permite a amplificação da seqüência, se o indivíduo tiver o alelo T. Para controle da eficiência de amplificação da reação da *PCR*, em cada microtubo além do par de *primers* do gene *CXCR2*, é utilizado um par *primers* para um outro gene (dito “controle”), nesse caso o *DRB* (do *HLA-DRB*, ou seja, antígeno leucocitário humano locus *DRB*)¹. Após a *PCR* é realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida seguida da coloração do gel por nitrato de prata. Se for observado que para o mesmo indivíduo houve amplificação com ambos os *primers forward*, significa que se trata de um heterozigoto para esse polimorfismo (indivíduo C/T), porém se houver amplificação somente para o *primer forward* C (por exemplo), o indivíduo é homozigoto para esse alelo (indivíduo C/C).

A reação da *PCR* foi padronizada num volume final de 13 µL contendo entre 150 e 300 ng de DNA genômico, tampão 1x (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4), 0,2 mM de cada dNTP (*GE Healthcare Life Sciences*, Buckinghamshire, Inglaterra), 0,681 µM de cada um dos *primers CXCR2 785C F* e *CXCR2 785T F*, 0,626 µM do *primer CXCR2 785 R*, 0,2 µM de cada um dos *primers Controle DRB F* e *Controle DRB R*, 2,0 mM MgCl₂ e 3 U de *Platinum Taq DNA Polimerase* (*Invitrogen*, São Paulo, SP, Brasil).

As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 96°C por 1 min., seguidos por 5 ciclos de 96°C por 25s, 70°C por 45s e 72°C por 25s; 21 ciclos de 96°C por 25s, 65°C por 50s e 72°C por 30s, e por fim 4 ciclos de 96°C por 30s, 55°C por 60s e 72°C por 90s.

3.3.2.2 Polimorfismo na base +1208 C/T

A genotipagem desse polimorfismo foi realizada por meio da técnica do *SSP-PCR* utilizando os seguintes *primers*:

<i>CXCR2</i> 1208T F	CCA TTG TGG TCA CAG GAA GT	627 pb
<i>CXCR2</i> 1208C F	CCA TTG TGG TCA CAG GAA GC	
<i>CXCR2</i> 1208 R	GTC TTG TGA ATA AGC TGC TAT GA	
Controle <i>APC</i> * F	ATG ATG TTG ACC TTT CCA GGG	256 pb
Controle <i>APC</i> * R	TTC TGT AAC TTT TCA TCA GTT GC	

* *APC* = *human adenomatous polyposis coli*; pb= pares de bases

A Reação de PCR foi padronizada num volume final de 13 µL contendo entre 100ng a 300ng de DNA genômico, Tampão 1x (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4), 0,2 mM de cada dNTP, 0,625 µM de cada um dos *primers CXCR2* 1208T F e *CXCR2* 1208C F, 0,271 µM do *primer CXCR2* 1208 R, 0,2 µM de cada

um dos *primers* Controle APC F e Controle APC R, 2,0 mM MgCl₂ e 3 U de *Platinum Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*).

As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 96°C por 1 min., seguidos por 5 ciclos de 96°C por 25s, 70°C por 45s e 72°C por 25s; 21 ciclos de 96°C por 25s, 65°C por 50s e 72°C por 30s, e por fim 4 ciclos de 96°C por 30s, 55°C por 60s e 72°C por 90s.

3.3.2.3 Polimorfismo na base +1440 G/A

A genotipagem foi realizada por meio da *PCR-RFLP*. Primeiramente foi realizada uma reação de *PCR* que amplifica 343 pb do gene *CXCR2* através dos seguintes *primers*:

Forward - 5' CCC CAT TGT GGT CAC AGG ACG 3'

Reverse - 5' GCC TCC CAA GTA GCT GTG ATT A 3'

A Reação de *PCR* foi padronizada num volume final de 50 µL contendo um total de 100 ng DNA genômico, Tampão 1x (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4), 0,2 mM de cada dNTP, 0,075 µM de cada *primer*, 2,0 mM MgCl₂ e 1 U de *Platinum Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*).

As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto. Sendo a extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Em seguida, foi realizada a metodologia do Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (*RFLP*, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) no volume de 20 µl para genotipar cada indivíduo. Cada reação foi composta por 17,6 µl do produto da *PCR*, 2 U da enzima de restrição *Hph I* (*New England*) e 2,0 µl do tampão da referida enzima. As reações foram incubadas por aproximadamente 12 horas (*overnight*) a 37°C, para permitir a digestão do produto da *PCR* gerando os seguintes fragmentos:

Alelo G (+1440G): 190 + 75 + 57 + 21 pb.

Alelo A (+1440A): 247 + 75 + 21 pb.

Os fragmentos obtidos por *PCR-RFLP* e as reações de *SSP-PCR* foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 10% (locus +785 e +1208) ou 14% (locus +1440). Os géis eram corados com nitrato de prata⁷⁰ e fotografados digitalmente por meio do fotodocumentador GDS 8000 System (UVP, Upland, CA, USA).

A seguir são apresentadas figuras ilustrativas dos géis de poliacrilamida que foram obtidos neste estudo. Algumas amostras genotipadas para os loci +785(C/T), +1208(T/C) e +1440(G/A) podem ser visualizadas nas Figuras 2, 3 e 4 respectivamente, sendo que o último locus também pode distinguir os diferentes genótipos por meio de eletroforese em gel de agarose a 4 % (Figura 5).

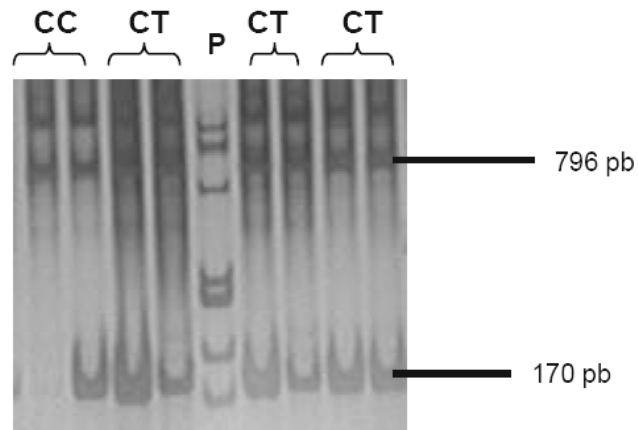


FIGURA 2 - Gel de poliacrilamida a 10% mostrando o resultado das reações de SSP-PCR para o locus +785(C/T). P = Marcador de peso molecular *PhiX* 174 digerido com *Hae III*. Cada dois *lanes* indicam o genótipo de um indivíduo. Para cada indivíduo era aplicado no primeiro *lane* a reação específica para o alelo T e no segundo *lane* a reação para o alelo C. A banda controle (796 pb) está presente em todas as amostras, o que confirma a eficiência da reação de PCR. O alelo é considerado positivo quando estão presentes a banda alelo-específica com o tamanho esperado (170 pb) em conjunto com a banda controle (796 pb).

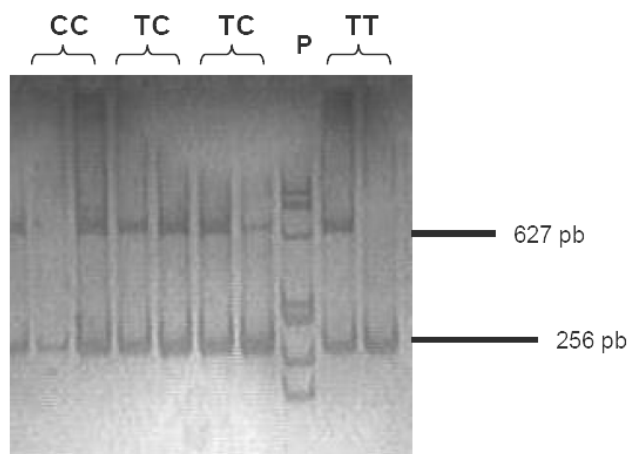


FIGURA 3 - Gel de poliacrilamida a 10% mostrando o resultado das reações de SSP-PCR para o locus +1208(T/C). P = Marcador de peso molecular *PhiX* 174 digerido com *Hae III*. Cada dois *lanes* indicam o genótipo de um indivíduo. Para cada indivíduo era aplicado no primeiro *lane* a reação específica para o alelo T e no segundo *lane* a reação para o alelo C. A banda controle (256 pb) está presente em todas as amostras, o que confirma a eficiência da reação de PCR. O alelo é considerado positivo quando estão presentes a banda alelo-específica com o tamanho esperado (627 pb) em conjunto com a banda controle (256 pb).

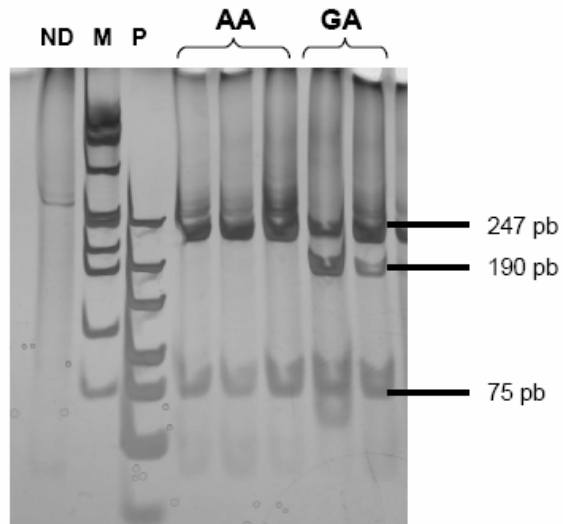


FIGURA 4 - Gel de poliacrilamida a 14% mostrando os padrões de digestão do locus +1440(G/A) obtidos com a enzima *Hph I*. M = Marcador de peso molecular (*Ultra Low Range, Fermentas*), P = Marcador de peso molecular *PhiX 174* digerido com *Hae III*, ND = amostra não-digerida.

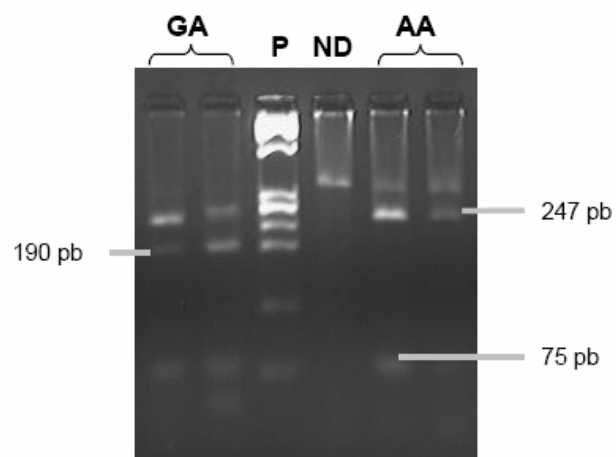


FIGURA 5 - Gel de agarose a 4% corado com brometo de etídio mostrando os padrões de digestão do locus +1440(G/A) obtidos com a enzima *Hph I*. P = Marcador de peso molecular *PhiX* 174 digerido com *Hae III*, ND = amostra não-digerida.

3.4 Análise Estatística dos Resultados

Associação entre polimorfismos genéticos e periodontite foi avaliada através dos testes de χ^2 e *odds ratio* utilizando-se o programa BioEstat versão 4.0 (UFPA, MCT, CNPq, Belém, PA, Brazil). Como foram observados genótipos com frequência baixa, ou seja, raros, foi utilizado o programa CLUMP⁷⁹ (<http://www.smd.qmul.ac.uk/statgen/dcurtis/software.html>) que emprega o método de simulações de Monte Carlo¹⁵. Foi realizada a análise de regressão logística múltipla para os polimorfismos do gene *CXCR2*, ajustando para as variáveis: idade, gênero, cor da pele e fumo, por meio do programa SAS versão 9.0⁷². A distribuição de cada polimorfismo em cada grupo (Controle e Periodontite) foi testada quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg por meio do programa ARLEQUIN⁷⁷, 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%.

Capítulos

4 Capítulos

4.1 Capítulo 1

A Novel PCR-RFLP Assay for the Detection of the Single Nucleotide Polymorphism at Position +1440 in the Human *CXCR2* gene

Publicado no periódico: Biochemical Genetics. 2007; 45: 737-41 (QUALIS A Internacional)

A Novel PCR-RFLP Assay for the Detection of the Single Nucleotide Polymorphism at Position +1440 in the Human CXCR2 gene

Aline C. Viana, Yeon J. Kim, Joni A. Cirelli, Silvana R. P. Orrico, Karen C. Curtis, Veridiana S. P. Cano, Sandro R. Valentini, Raquel Mantuanelli Scarel-Caminaga.

Received: 6 February 2007 / Accepted: 23 May 2007 / Published online: 16 October 2007. Springer Science+Business Media, LLC 2007.

Abstract We designed a novel PCR-RFLP assay to genotype for the CXCR2 +1440 (G/A) single nucleotide polymorphism, which provides a simple, low-cost, practical, and reproducible method. Allele frequencies in healthy Brazilian individuals were found to be 0.65% for allele A and 0.35% for allele G.

Keywords PCR-RFLP - Polymorphism - CXCR2 - Human

Introduction

The human chemokine receptor CXCR2 (previously called IL8RB) is a high-affinity receptor for interleukin-8 (IL-8). Cellular activities of IL-8 are mediated by CXCR2 and CXCR1 (IL8RA), which are encoded by two single-copy genes located on chromosome 2q34-35 (Holmes et al. 1991; Morris et al. 1992). The two receptors maintain 78% of amino acid similarity and do not demonstrate differences in their

capacity to bind IL-8 (Lee et al. 1992). However, CXCR1 binds only IL-8, whereas CXCR2 binds other CXC chemokines with similar high affinity, such as the growth-related oncogene (GRO α , GRO β , GRO γ) and neutrophil-activating peptide 2 (Baggiolini 1998).

A. C. Viana, Y. J. Kim, J. A. Cirelli, S. R. P. Orrico

Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry, UNESP – São Paulo State University, R. Humaitá', 1680 Centro, Araraquara, São Paulo 14801-903, Brazil

K. C. Curtis, R. M. Scarel-Caminaga*

Morphology Department, School of Dentistry, UNESP – São Paulo State University, R. Humaitá', 1680 Centro, Araraquara, São Paulo 14801-903, Brazil

*e-mail: raquel@foar.unesp.br

V. S. P. Cano, S. R. Valentini

Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP – São Paulo State University, Rod. Araraquara-Jau, Km 01, Araraquara, São Paulo 14801-902, Brazil

In humans, the CXCR2 gene (Genbank accession number M99412) consists of 11 exons that are differentially spliced, giving rise to distinct messenger RNA variants (Sprenger et al. 1994). Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the CXCR2 gene were described by Renzoni et al. (2000): +785 (C/T) located in exon 11, and

+1208 (T/C) and +1440 (G/A) in the 3' untranslated area of exon 3, which demonstrated strong linkage disequilibrium.

Several reports indicate that CXCR2 SNPs might provide valuable information for pathogenesis and individual susceptibility to chronic inflammatory conditions involving neutrophil recruitment, especially rheumatoid and respiratory diseases (Renzoni et al. 2000; Kato et al. 2000; Gupta et al. 2004). To genotype individuals to these SNPs, methods like sequence-specific primer-polymerase chain reaction (SSP-PCR) with conventional thermal cyclers (Renzoni et al. 2000; Duymaz-Tozkiir et al. 2005; Kamali-Sarvestani et al. 2006) and PCR amplification of specific alleles (PASA) with a real-time thermal cycler (Gupta et al. 2004) have been employed.

A simple PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) assay, however, has not been previously reported for the +1440 SNP. We designed a novel PCR-RFLP method for genotyping this polymorphism.

Materials and methods

The utilization of the NEBcutter program for restriction enzyme site mapping (New England Biolabs, <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>; <http://www.neb.com>) showed that the HphI restriction enzyme would be useful to distinguish the different alleles of the +1440 SNP in the CXCR2 gene. Buccal epithelial cells of a southeastern Brazilian population were used as a source of DNA for PCR amplifications as described by Trevilatto and Line (2000). The protocol was approved by the local institutional ethics committee (CEP-FOAr/UNESP 57/04).

PCR Primers and Conditions

The forward primer (5' CCC CAT TGT GGT CAC AGG ACG 3') starts at position 11059 and the reverse primer (5' GCC TCC CAA GTA GCT GTG ATT A 3') at position 11360 of the sequence M99412. It is worth mentioning that the C base (bold) at the 3' end of the forward primer was mutated from an A to introduce an enzyme site for the restriction enzyme to detect another CXCR2 polymorphism (a method is under development).

The PCR in a final volume of 50 μ l was carried out using the following conditions: a total of 100 ng of genomic DNA was amplified in a PCR mixture containing 1x buffer (pH 8.4, 10 x solution 200 mM Tris-HCl, and 500 mM KCl, Invitrogen, São Paulo), 0.2 mM each dNTP (GE-Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England), 0.075 μ M each primer (Invitrogen, Frederick, MD), 2.0 mM MgCl₂, and 1 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo).

The samples were heated to 95°C for 3 min to induce the initial denaturation, followed by 35 cycles of 95°C for 1 min, 64°C for 1 min, and 72°C for 1 min, and a final extension step of 72°C for 5 min, using the thermocycler Mastercycler Gradient Eppendorf (Hamburg, Germany). PCR products (343 bp) were visualized on a 2% agarose gel (BioAgency, São Paulo) stained with ethidium bromide (BioAgency) using an ultraviolet light transilluminator (GDS 8000 System, UVP, Upland, CA).

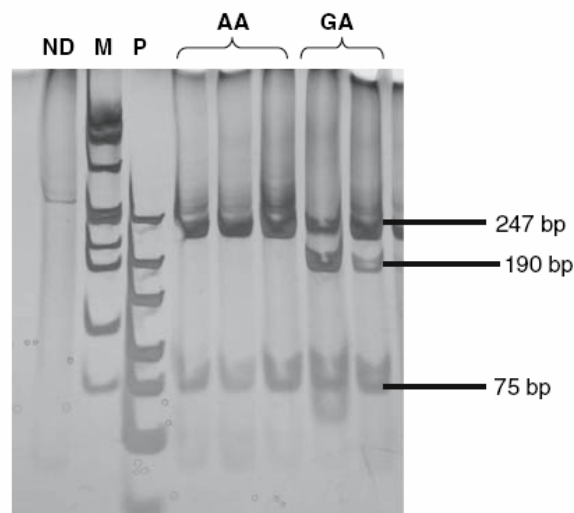
RFLP Conditions

The RFLP assay was performed in 20 μ l reaction mixture containing the PCR product (17.6 μ l), enzyme HphI (New England, 2 U per reaction), and buffer (2.0 μ l). The

reactions were incubated at 37°C overnight. After digestion, the A allele gave three fragments of 247, 75, and 21 bp, and the G allele gave four fragments of 190, 75, 57, and 21 bp.

The RFLP products were analyzed in a 14% polyacrylamide (USB, Cleveland, Ohio) gel electrophoresis stained by the rapid silver staining method (Sanguinetti et al. 1994) (Fig. 1). It is possible, however, to resolve the fragments in a 4% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide for genotyping (Fig. 2).

Fig. 1 Polyacrylamide gel (14%) showing the results of digestion with *HphI* enzyme. Lane M, 10 bp molecular weight marker (Fermentas). Lane P, PhiX 174 *HaeIII* molecular weight marker. Lane ND, sample not digested



Automated electrophoresis was used to validate this method (ABI Prism 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems, Foster City, CA). The amplified fragment (343 bp) of the CXCR2 gene (containing the +1440 SNP) was submitted to purification using a commercial kit (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE-Healthcare Life Sciences). The purified PCR products (300 ng) were sequenced using 4 µl Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems), 3.2 pmol reverse primer, in a reaction with a final volume of 20 µl (Scarel et al. 2000) (Fig. 3).

Fig. 2 Ethidium bromide-stained 4% agarose gel showing the results of digestion with *HphI* enzyme. Lane P, PhiX 174 *HaeIII* molecular weight marker. Lane ND, sample not digested

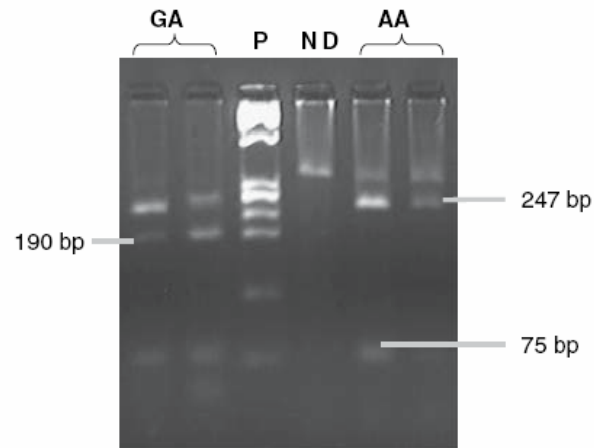
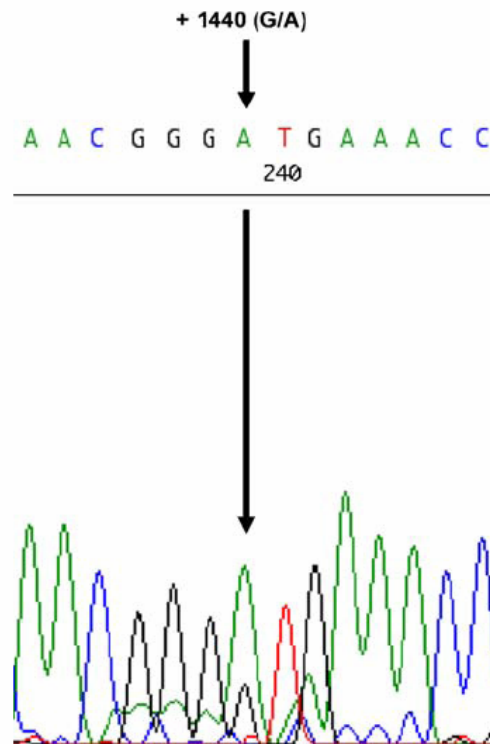


Fig. 3 Sequence analysis of the *CXCR2* gene polymorphism (+1440 G/A). Representative electropherogram of a heterozygous individual demonstrating the sequence immediately surrounding the polymorphic base (arrows). The presence of two peaks at the same position represents a heterozygous genotype



Results and Conclusion

The allele frequencies in a total of 119 healthy individuals and 123 individuals with periodontal disease are shown in Table 1. The significance of the difference in the

observed frequencies was assessed by the Exact Fisher Test, which demonstrated no difference between groups ($p = 0.924$). Note that the analyzed population has a high percentage of heterozygosity, as well.

In conclusion, the new PCR-RFLP assay using the HphI enzyme to genotype for the CXCR2 +1440 SNP provides a simple, low-cost, practical, and reproducible method, without the necessity for allele-specific oligonucleotides or the use of a real-time thermal cycler.

Table 1 Allele frequency of CXCR2 +1440 (G/A) polymorphism in Brazilians

Allele	Healthy Group <i>n</i> (%)	Periodontal disease group <i>n</i> (%)
A	155 (65.1)	159 (64.7)
G	83 (34.9)	87 (35.3)
Heterozygosity	0.697	0.707

Acknowledgments

This work was supported by FAPESP grants 03/10424-0, 06/04492-1, and CAPES.

References

- Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565–568
- Duymaz-Tozkir J, Yilmaz V, Uyar FA, Hajeer AH, Saruhan-Direskeneli G, Gul A (2005) Polymorphisms of the IL-8 and CXCR2 genes are not associated with Behçet's disease. *J Rheumatol* 32:93–97

Gupta M, Song P, Yates CR, Meibohm B (2004) Real-time PCR-based genotyping assay for CXCR2 polymorphisms. *Clin Chim Acta* 341:93–100

Holmes WE, Lee J, Kuang W-J, Rice GC, Wood WI (1991) Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 253:1278–1280

Kamali-Sarvestani E, Nikseresht A-R, Aliparasti M-R, Vessal M (2006) IL-8 (-251 A/T) and CXCR2 (+1208 C/T) gene polymorphisms and risk of multiple sclerosis in Iranian patients. *Neurosci Lett* 414:159–162

Kato H, Tsuchiya N, Tokunaga K (2000) Single nucleotide polymorphisms in the coding regions of human CXC-chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CXCR3. *Genes Immun* 1:330–337

Lee J, Horuk R, Rice GC, Bennet GL, Camerato T, Wood WI (1992) Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *J Biol Chem* 267:16283–16287

Morris SW, Nelson N, Valentine MB, Shapiro DN, Look AT, Kozlosky CJ, Beckmann MP, Cerretti DP (1992) Assignment of the genes encoding human

interleukin-8 receptors types 1 and 2 and an interleukin-8 receptor pseudogene to chromosome 2q35. *Genomics* 14:685–691

Renzoni E, Lympny P, Sestini P, Pantelidis P, Wells A, Black C et al (2000) Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXCR1 and 2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Arthritis Rheum* 43:1633–1640

Sanguinetti CJ, Dias EN, Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17:915–921

Scarel RM, Trevilato PC, Di Hipolito O Jr, Camargo LEA, Line SRP (2000) Absence of mutations in the homeodomain of the MSX1 gene in patients with hypodontia. *Am J Med Genet* 92:346–349

Sprenger H, Lloyd AR, Lautens LL, Bonner TI, Kelvin DL (1994) Structure, genomic organization, and expression of the human interleukin-8 receptor B gene. *J Biol Chem* 269:11065–11072

Trevilatto PC, Line SRP (2000) Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol* 18:6–9.

4.2 Capítulo 2

Association of haplotypes formed by polymorphisms in the *CXCR2* gene with susceptibility to periodontitis in Brazilians

Artigo a ser submetido para publicação

Association of haplotypes formed by polymorphisms in the *CXCR2* gene with susceptibility to periodontitis in Brazilians

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

Abstract

Background: Interleukin 8 (IL-8) is a chemokine related with the initiation and amplification of acute inflammatory reactions and in the chronic inflammatory process. Its cellular activities are mediated by two receptors: CXCR-1 and CXCR-2. CXCR-2 has also an important role in the inflammatory process, confirmed by studies that associated polymorphisms in the *CXCR2* gene with chronic inflammatory conditions, especially respiratory and rheumatoid diseases.

Objective: To investigate whether the +785(C/T), +1208(T/C) and +1440(G/A) single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CXCR2* gene, as well as their haplotypes, would be associated with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

Methods: DNA was extracted from buccal epithelial cells of 500 Brazilian individuals (Control = 224, Periodontitis group [PG] = 276). The +785 and +1208 SNPs were investigated using the Sequence Specific Primers Polymerase Chain Reaction method (SSP-PCR). The +1440(G/A) SNP was genotyped by the PCR-

RFLP method (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism).

Results: The allele and genotype frequencies of the studied polymorphisms were similar between Control and Periodontitis groups. Considering the total sample, the frequency of TCG haplotype was significantly higher ($p < 0.01$, adjusted odds ratio [OR] = 4.00; 95% CI = 1.496-10.726) in Periodontitis group than in Controls. The heterozygous haplotype TCG/CCA seemed to be related with increased susceptibility to Periodontitis in the total casuistic ($p = 0.01$, adjusted OR = 3.67 95% CI = 1.326-10.192).

Conclusion: These data indicate an association of haplotypes in the *CXCR2* gene with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

Key words: periodontitis, polymorphisms, *CXCR2*, interleukin 8.

Introduction

Periodontitis is a multifactorial disease that involves bacterial stimuli as primordial cause¹⁷ and has a progression closely related to the host immunoinflammatory response⁵⁴. The inflammatory process in the periodontitis is one of the factors responsible for tissue damage resulting in periodontal pockets formation, destruction of the periodontal ligament and adjacent support bone^{47,50}. Previous studies have reported the importance of specific cytokines, such as

interleukin 1 (IL-1)²⁵, IL-2³², IL-4⁵², IL-6¹⁹ and IL-10⁵³, in the role of this inflammatory process.

Among the cytokines, interleukin 8 (IL-8), a member of the CXC chemokines family, is primarily responsible for the activation and migration of neutrophils into tissue from peripheral blood⁴⁶. The term “CXC” is derived from the chemokine structure that includes two Cysteines with one intervening amino acid (named “X”) ²⁹. IL-8 is also involved in the initiation and amplification of acute inflammatory reactions and in the chronic inflammatory process¹⁰. There are two specific receptors for IL-8, CXCR-1 and CXCR-2, which are responsible for mediate cellular activities of this cytokine. CXCR-1 and CXCR-2 have 77% of the protein amino acid sequence in common³⁰ and are encoded by 2 single-copy genes located on chromosome 2q34-35²⁸. CXCR-2 binds with high affinity IL-8 and other CXC chemokines, whereas CXCR-1 binds only IL-8³.

The *CXCR2* gene (Genbank accession number M99412) is composed by 3 exons showing an open reading frame encoded entirely in the third exon⁴⁵. Some single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CXCR2* gene have been reported: the +785(C/T) that is located in exon 3 (refSNP ID: rs2230054); and +1208(T/C) (refSNP ID: rs1126579) and +1440(G/A) (refSNP ID: rs1126580) in the 3' untranslated area of exon 3³⁷. The rs number means the identification of a specific SNP, which is present into NCBI's Entrez system³¹.

Associations of those SNPs with chronic inflammatory conditions, especially respiratory and rheumatoid diseases, were confirmed by several

studies^{8,21,37}. Renzoni et al.³⁷ have found that individuals homozygous for both +785C and +1208T alleles of the *CXCR2* gene were more susceptible in developing systemic sclerosis.

Although the importance of the polymorphisms in the *CXCR2* gene in inflammatory process has been already confirmed^{4,21,36}, it was not found previous studies evaluating whether those SNPs may be related with periodontitis. Therefore, the aim of this study was to investigate whether the cited three single nucleotide polymorphisms in the *CXCR2* gene, as well as their haplotypes, would be associated with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

Material and Methods

Selection of subjects

A total of 500 subjects from the State of São Paulo (Southeastern region of Brazil) were recruited for this study from the patient pool of the School of Dentistry at Araraquara – São Paulo State University/UNESP (from November 2004 until May 2007). All subjects signed a consent form that was approved by an Institutional Review Board (CEP-FOAr/UNESP 57/04). Subjects should have good general health and at least 10 remaining teeth. 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. The characteristics of the study population are showed in Table 1.

Diagnosis of periodontitis was established considering the patient medical and dental histories, clinical signs and parameters including probing depth (PD), clinical attachment loss (CAL) and bleeding on probing (Trinity® probe – Campo Mourão, Paraná, Brazil). Measurements of PD and CAL were assessed at six sites around each tooth, by two calibrated examiners (Weighted K 's = 0.74)⁹.

The subjects were categorized into two groups:

- Control group (GC): subjects exhibiting no sites with CAL and $PD \geq 3$ mm and bleeding on probing.
- Periodontitis group (PG): 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 3mL of a 3% glucose mouthwash for 2 minutes⁴⁸. DNA was extracted with sequential phenol/chlorophorm/isoamiliic alcohol (25:24:1) solution and precipitated with salt ethanol solution⁴¹. The SNPs +785(C/T) and +1208(T/C) in the *CXCR2* gene were investigated using the sequence specific primers polymerase chain reaction method (SSP-PCR)³⁷. The +1440(G/A) polymorphism was analyzed using a new polymerase chain reaction-restriction fragment length method (PCR-RFLP)⁵¹.

Table 1. Characteristics of the study groups

	Control(n=224)	PG(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 (%)	n(%)	
Female	134 (59.8)	175(63.4)	309(61.8)
Male	90 (40.2)	101(36.6)	191(38.2)
Skin Color	n(%)	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(%)	n(%)	
Non-smokers	204(91.0)	211(76.4)	415(83.0)
Smokers	20(9.0)	65(23.6)	85(17.0)

Following, the details of the method used for investigating the cited SNPs are described.

- SNP+785(C/T) (rs2230054):

The amplification was performed using the primers: *CXCR2* 785 C *Forward* 5' CGT CCT CAT CTT CCT GCT C 3', *CXCR2* 785 T *Forward* 5' CGT CCT CAT CTT CCT GCT T 3' and *Reverse* 5' GGA GTC CAT GGC GAA ACT TC 3'. In order to confirm PCR amplifications, a set of control primers was used: *DRB* (genes that encode a type of protein of class II Major Histocompatibility Complex - MHC) *Forward* 5' TGC CAA GTG GAG CAC CCA A 3' and *DRB Reverse* 5'GCA TCT TGC TCT GTG CAG AT 3'³⁷. SSP-PCR reactions in a final volume of 13 μ L was carried out containing: 1x buffer (20mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4 -

Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil), 0.2 mM of each dNTP (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England), 0.681 μ M of each primer *CXCR2* 785C F or *CXCR2* 785T F, 0.626 μ M of *CXCR2* 785 R, 0.2 μ M of each primer Control *DRB* F e Control *DRB* R, 2.0 mM MgCl₂, 3 U Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) and 150 ng of genomic DNA. The samples were heated at 96°C for 1 min followed by 5 cycles at 96°C for 25 seconds, 70°C for 45 seconds and 72°C for 25 seconds; 21 cycles at 96°C for 25 seconds, 65°C for 50 seconds and 72°C for 30 seconds, and 4 cycles at 96°C for 30 seconds, 55°C for 60 seconds and 72°C for 90 seconds, using the thermocycler Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany).

- SNP +1208(T/C) (rs1126579):

For amplifying the *CXCR2* gene fragment the following primers were used: *CXCR2* 1208T *Forward* 5' CCA TTG TGG TCA CAG GAA GT 3', *CXCR2* 1208 C *Forward* 5' CCA TTG TGG TCA CAG GAA GC 3' and Reverse 5' GTC TTG TGA ATA AGC TGC TAT GA 3'. Controls primers used: *APC* (*human adenomatous polyposis coli*) *Forward* 5' ATG ATG TTG ACC TTT CCA GGG 3' and *APC Reverse* 5' TTC TGT AAC TTT TCA TCA GTT GC 3' ³⁷. PCR reactions in a final volume of 13 μ L was carried out containing: 1x buffer (20mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4 - Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil), 0.2 mM of each dNTP (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England), 0.625 μ M of each primer

CXCR2 1208C F or *CXCR2* 1208T F, 0.271 μ M of *CXCR2* 1208 R, 0.2 μ M of each primer Control *APC* F e Control *APC* R, 2.0 mM MgCl₂, 3 U Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) and 150 ng to 300 ng of genomic DNA. The samples were heated at 96°C for 1 min followed by 5 cycles at 96°C for 25 seconds, 70°C for 45 seconds and 72°C for 25 seconds; 21 cycles at 96°C for 25 seconds, 65°C for 50 seconds and 72°C for 30 seconds, and 4 cycles at 96°C for 30 seconds, 55°C for 60 seconds and 72°C for 90 seconds.

- SNP +1440(G/A) (rs1126580):

PCR reactions in a final volume of 50 μ L was carried out containing: 1x buffer (20mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4 - Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil), 0.2 mM of each dNTP (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England), 0.075 μ M of each primer (*Forward* - 5' CCC CAT TGT GGT CAC AGG ACG 3' and *Reverse* - 5' GCC TCC CAA GTA GCT GTG ATT A 3'⁵¹, 2.0 mM MgCl₂, 1 U Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) and 100ng of genomic DNA. The samples were heated at 95°C for 3 minutes followed by 35 cycles at 95°C for 1 minute, 64°C for 1 minute and 72°C for 1 minute, with a final extension step at 72°C for 5 minutes.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) assay was performed in a total volume of 20 μ L as described previously⁵¹. Briefly, the reactions were performed in a mixture containing 17.6 μ L of PCR product, restriction enzyme

Hph I (New England – 2.0 U per reaction) and buffer (2.0 µL) incubated at 37°C overnight.

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 studies³⁵. The parameters considered was similar those used by Brett et al.⁶, including the chronic periodontitis prevalence of 0.06¹¹. The frequencies of each polymorphism in the *CXCR2* gene were analyzed by standard chi-squared test or by the CLUMP program (<http://www.mds.qmw.ac.uk/statgen/dcurtis/software.html>) that employs the Monte Carlo simulations⁴⁴. The use of the Monte Carlo method avoids the need for a Bonferroni correction and the difficulty of assessing the significance of rarer alleles. The CLUMP program is designed for use in genetic case-control studies where multiple alleles are being considered and the observed frequencies of some alleles are rare¹⁸.

The risk associated with individual alleles or genotypes was calculated as the odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI) using BioEstat software version 4.0 (UFPA, MCT, CNPq, Belém, PA, Brazil). This software was also used to calculate Hardy-Weinberg expectations. Differences were considered significant when $p < 0.05$. Multiple logistic regression analysis was performed to quantify the association between periodontitis and each polymorphism individually after adjusting

for age, gender, skin color and smoking status (SAS version 9.0)⁴⁰. In order to estimate haplotype and to calculate linkage disequilibrium the ARLEQUIN program was used (v.2.0-<http://anthro.unige/charlequin>)⁴³. Haplotype frequencies were confirmed by direct counting and differences in their distribution between the studied groups were assessed by the CLUMP program.

Results

The casuistic investigated here was composed mainly by female subjects (61.8%), Whites (58.0%) and Non-smokers (83.0%) (Table 1). The subjects were classified according to the skin color composition proposed as by Peres et al.³⁴ 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 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.

To exclude the possible confounding effect of smoking, a subgroup composed by only individuals who had never smoked or that are former-smokers for at least five years, named Non-smokers, was statistically analyzed.

The genotype and allele frequencies of the studied population are shown in Table 2. No differences were found for all SNPs in the analyses of either the total sample or the White group. Regarding the analysis including only non-smokers individuals, it was observed a significant difference in the genotype frequency of the +1440(G/A) SNP ($p = 0.039$; $OR=1.62$). However, the association did not hold after adjusting for age, gender and skin color (Table 2). The genotype distributions of the three *CXCR2* SNPs were not consistent with the assumption of Hardy-Weinberg equilibrium. It was observed strong linkage disequilibria between all pair of loci, justifying the analyses of polymorphisms as haplotypes.

Haplotype frequencies

The analyses of haplotypes were made considering only the subjects who were genotyped for all the three SNPs together. Because of difficulties in genotyping some individuals to each of the investigated SNPs, 2.6% of the casuistic ($n=13$) were not included in the haplotypes analyses. The distribution of haplotypes arranged as alleles (Table 3) suggested a trend towards a demonstrating difference between Periodontitis and Control groups ($p = 0.057$), which was confirmed comparing the frequency of the TCG allele with the other haplotypes grouped together. In this way, it was observed a significant predominance of the TCG allele in the Periodontitis group ($p = 0.005$, crude $OR = 3.54$; 95% $CI = 1.44-8.69$). This predominance was maintained even after controlling for age, gender, skin colour and smoking habits, by using multiple logistic regression analysis (adjusted $OR = 4.00$;

95% CI = 1.496-10.726). Considering the subgroups Non-smokers and Whites no significant differences were observed ($p = 0.219$ and 0.373 respectively). In this study, CCA haplotype was predominant in all the evaluated groups. On the other hand, the rarest haplotype was CCG, since it was represented by only one subject in the Periodontitis group (Table 3).

When the haplotypes were organized as genotypes (Table 4), their distribution between the Control and Periodontitis groups in the total sample was statistically different ($p = 0.035$). In this analysis, we could also observe a difference in the frequency of TCG/CCA haplotype ($p = 0.015$) between the Control and Periodontitis groups, demonstrating that individuals with this haplotype have 3.22 times more probability to develop periodontitis (Table 4). This data was also verified with multiple logistic regression analysis and demonstrated an increase in the significance of the values ($p = 0.01$; adjusted OR = 3.67; CI = 1.326-10.192).

Discussion

Periodontitis has a complex etiology with bacteria as primordial etiologic agent⁵⁰ and includes risk factors such as smoking habits¹⁵ and genetic polymorphisms⁴². Previous studies have suggested that inflammatory cytokines also contribute to the periodontitis pathogenesis^{14,22,33}. Thus, it is reasonable to assume that genetic variation, i.e. SNPs, in the genes of cytokines and the receptors for these

genes could influence their regulation⁷, and perhaps contribute to periodontitis susceptibility.

In the present study, three SNPs in the *CXCR2* gene were analyzed. The analyses of *CXCR2* haplotypes arranged as alleles and genotypes showed significant results when the total sample was considered. The TCG haplotype seemed to be 3.54 times more likely to develop periodontitis than the others (Table 3). When haplotypes were arranged as genotypes, the TCG/CCA demonstrated a similar odds ratio value (OR=3.22; 95% CI=1.44-8.69 – Table 4). It must be highlighted that those significant results were observed in the analyses considering the total sample, in which were included individuals with smoking habits (17.0%). On the other hand, the genetic analysis including only smokers revealed no significant association (data not showed). This result could be obtained because the low population of smokers. Smoking is a well-established risk factor for periodontitis⁵, and in this study, the smoking habit was confirmed as a confounding factor in the analysis of the relationship between polymorphisms and disease status (OR=3.95; 95% CI=2.17-7.17). Therefore, multiple logistic regression analysis was applied also in the analysis of the distribution of haplotypes between the studied groups. ORs values adjusted for age, gender, skin color and smoking habits indicate that polymorphisms in the *CXCR2* gene are associated with susceptibility to periodontitis (OR[#] = 4.006, 95% CI = 1.496-10.726 – Table 3; OR[#] = 3.676, 95% CI = 1.326-10.192 – Table 4).

In this Brazilian studied population we found a predominance of individuals who were heterozygous to all the three SNPs in the *CXCR2* gene (Table

2). This result is in accordance with those observed for other populations^{16,37}. The analyses of +785 and +1208 *CXCR2* polymorphisms demonstrated no association with periodontitis. Similarly, it was not found any association between those SNPs with Behçet's disease, a systemic inflammatory condition^{12,23}. Also, for the +1208 SNP, a lack of association was found with multiple sclerosis²⁰. Regarding to the +1440(G/A) SNP, Brazilian individuals with the GG genotype were not found. Similarly, this genotype was observed in lower frequency (0.17) in a Caucasian population from the SNP500Cancer project⁴⁹.

In spite of it was observed an association of the +1440(G/A) SNP with periodontitis susceptibility in Non-smokers (OR=1.62; 95% CI=1.04-2.53 - Table 2), multiple comparisons showed that it was a spurious result, since the association did not hold after adjusting for age, gender and skin color (OR=0.70; 95% IC=0.42-1.52). In contrast of our result, a significant protector effect was conferred to the G allele (+1440 SNP) in combination with the T allele (+1208 SNP) against to the development of Classic Kaposi Sarcoma (CKS)⁸. It is worth to mention that Kaposi sarcoma is an inflammatory-mediated disease characterized by localized pathogenesis involving the expression of proinflammatory cytokines²⁶. The genetic variants +1208(T/C) and +1440(G/A) in the *CXCR2* gene are located in the 3' untranslated region of exon 3 and have the capacity to alter mRNA processing, stability, or translation^{1,45}. Functional studies suggest that *CXCR2* indirectly activates fibroblasts by mediating the recruitment of T cells³⁹, a process similar to that observed both in Kaposi sarcoma spindle cell transformation⁸ and in sites presenting periodontitis⁵⁰.

However, it was not found studies that investigate whether polymorphisms in the *CXCR2* gene could influence the expression level of the CXCR-2 protein nor whether a SNP could modify the capacity of the receptor to bind to the IL-8.

In this study we have observed that none of the investigated polymorphisms in the *CXCR2* gene were in the Hardy-Weinberg equilibrium. It could be caused because an apparent excess of heterozygous for the +785(C/T) and +1208(T/C) SNPs, and the absence of individuals with the GG genotype for the +1440(G/A) SNP in the *CXCR2* gene. Similar excess of heterozygous causing failures of the Hardy-Weinberg equilibrium were noted in studies focusing polymorphisms in genes like *CARD15*¹³ and of the HLA complex²⁴. As the cause of our observed homozygous deficiency (consequently, excess of heterozygous), we have been able to eliminate the nonselective factors of both different male and female genotype frequencies (data not showed) and avoidance of consanguinity; consequently, the main reasonable explanations to the observed no Hardy-Weinberg equilibrium in our study are the ethnic composition and the size of the studied Brazilian population. Brazilian population is formed by a high miscegenation between different ethnic populations like Europeans (mainly Portuguese), Africans and autochthones Amerindians². Because of this fact, the classification into ethnic groups is not recommended in studies involving Brazilian individuals²⁷ and studies with Brazilian population have used the skin color categorization^{34,38}. Due to this reason, it was made in the present study. However, no significant results were

obtained when an analysis of the Control and Periodontitis groups regarding to the skin color was performed (data not showed).

To our knowledge, our findings are the first to indicate an association of haplotypes in the *CXCR2* gene with susceptibility to periodontitis in Brazilian individuals.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP grant 03/10424-0 and CAPES.

Table 2. Frequencies of CXCR2 SNPs in control and PG individuals

SNP	Total			Non-smokers			Whites		
	Control n(%)	PG n(%)	p	Control n(%)	PG n(%)	p	Control n(%)	PG n(%)	p
+785									
Allele	n = 434	n = 544	0.8562	n = 396	n = 416	0.6968	n = 290	n = 280	0.9495
T	204 (47.0)	260 (48.0)		184 (46.5)	200 (48.0)		137 (47.3)	134 (47.9)	
C	230 (53.0)	284 (52.0)		212 (53.5)	216 (52.0)		153 (52.7)	146 (52.1)	
Genotype	n = 217	n = 272	0.8507	n = 198	n = 208	0.5708	n = 145	n = 140	0.681
TT	5 (2.3)	8 (3.0)		4 (2.2)	7 (3.4)		2 (1.4)	4 (2.9)	
TC	194 (89.4)	244 (89.7)		176 (88.8)	186 (89.4)		133 (91.7)	126 (90.0)	
CC	18 (8.3)	20 (7.3)		18 (9.0)	15 (7.2)		10 (6.9)	10 (7.1)	
+1208									
Allele	n = 436	n = 552	0.7314	n = 398	n = 422	0.9606	n = 290	n = 284	0.8612
T	215 (49.3)	265 (48.0)		195 (49.0)	205 (48.6)		142 (49.0)	136 (47.9)	
C	221 (50.7)	287 (52.0)		203 (51.0)	217 (51.4)		148 (51.0)	148 (52.1)	
Genotype	n = 218	n = 276	0.2232	n = 199	n = 211	0.815	n = 145	n = 142	0.7057
TT	21 (9.6)	32 (11.6)		19 (9.6)	22 (10.5)		15 (10.4)	16 (11.3)	
TC	173 (79.4)	201 (72.8)		157 (78.9)	161 (76.3)		112 (77.2)	104 (73.2)	
CC	24 (11.0)	43 (15.6)		23 (11.5)	28 (13.2)		18 (12.4)	22 (15.5)	
+1440									
Allele	n = 438	n = 552	0.309	n = 398	n = 422	0.1884	n = 292	n = 284	0.5489
G	152 (34.7)	210 (38.0)		137 (34.5)	165 (39.1)		103 (35.3)	108 (38.1)	
A	286 (65.3)	342 (62.0)		261 (65.5)	257 (60.9)		189 (64.7)	176 (61.9)	
Genotype	n = 219	n = 276	0.118	n = 199	n = 211	0.039*	n = 146	n = 142	0.3561
GG	0	0		0	0		0	0	
GA	152 (69.4)	210 (76.0)		137 (68.8)	165 (78.2)	OR=1.62	103 (70.5)	108 (76.0)	
AA	67 (30.6)	66 (24.0)		62 (31.2)	46 (21.8)	CI=1.04-2.53	43 (29.5)	34 (24.0)	

* P < 0.05, OR# adjusted for age, gender, skin color and smoke habit.

Table 3. Distribution of CXCR2 locus haplotypes found in the studied groups

Haplotypes	Total		Non-smokers		Whites	
	Control n(%)	PG n(%)	Control n(%)	PG n(%)	Control n(%)	PG n(%)
+785 +1208 +1440	n = 430	n = 544	n = 392	n = 416	n = 288	n = 280
TCG	6 (1.4)	26 (4.7)	6 (1.5)	18 (4.3)	5 (1.7)	13 (4.6)
CCA	192 (44.6)	233 (42.8)	176 (44.8)	180 (43.2)	129 (44.8)	121 (43.2)
TTG	131 (30.4)	163 (30.0)	116 (29.7)	129 (31.0)	90 (31.4)	84 (30.0)
TTA	45 (10.7)	47 (8.6)	42 (10.7)	37 (8.9)	28 (9.7)	25 (8.9)
CTA	22 (5.1)	33 (6.0)	20 (5.1)	21 (5.0)	16 (5.5)	15 (5.3)
TCA	20 (4.6)	24 (4.4)	18 (4.6)	16 (3.8)	13 (4.5)	12 (4.3)
CTG	14 (3.2)	17 (3.1)	14 (3.6)	14 (3.4)	7 (2.4)	9 (3.2)
CCG	0	1 (0.4)	0	1 (0.4)	0	1 (0.5)
P	0.057		0.219		0.373	
Haplotype						
TCG	6	26				
Others	424	518				
P	0.005					
OR	3.54		OR# 4.006			
	(95% CI = 1.44 - 8.69)		(95% CI = 1.496-10.726)			

* P < 0.05, OR# adjusted for age, gender, skin color and smoke habit.

Table 4. Distribution of CXCR2 locus haplotypes (arranged as genotypes) found in the studied groups

Genotypes	Total		Non-smokers		Whites	
	Control n(%)	PG n(%)	Control n(%)	PG n(%)	Control n(%)	PG n(%)
+785 +1208 +1440/ +785 +1208 +1440						
	n = 215	n = 272	n = 196	n = 208	n = 144	n = 140
TCG/CCA	6 (3.12)	23 (8.4)	6 (3.0)	15 (7.2)	5 (3.5)	12 (8.5)
TTG/CCA	111 (51.6)	138 (50.7)	99 (50.5)	113 (54.3)	77 (53.4)	72 (51.4)
TTA/CCA	41 (19.0)	42 (15.4)	38 (19.4)	33 (15.8)	25 (17.3)	22 (15.7)
TTG/CTA	16 (7.4)	22 (8.0)	14 (7.1)	14 (6.7)	11 (7.6)	11 (7.8)
TCA/CCA	15 (6.9)	16 (5.9)	14 (7.1)	9 (4.3)	12 (8.3)	8 (5.7)
CTG/CCA	13 (6.0)	11 (4.0)	13 (6.9)	9 (4.3)	6 (4.3)	6 (4.6)
TTA/CTA	3 (1.4)	3 (1.1)	3 (1.5)	2 (1.0)	2 (1.4)	1 (0.7)
TTG/TCA	3 (1.4)	3 (1.1)	2 (1.0)	2 (1.0)	1 (0.7)	1 (0.7)
CTG/CTA	1 (0.46)	6 (2.2)	1 (0.5)	5 (2.4)	1 (0.7)	3 (2.1)
CTA/CCA	2 (0.9)	2 (0.73)	2 (1.0)	0	2 (1.4)	0
CCA/CCA	2 (0.9)	0	2 (1.0)	0	1 (0.7)	0
TCA/TCA	1 (0.46)	0	1 (0.5)	0	0	0
TTG/TTA	1 (0.46)	0	1 (0.5)	0	1 (0.7)	0
TCG/TCA	0	3 (1.1)	0	3 (1.4)	0	1 (0.7)
TTA/TCA	0	2 (0.73)	0	2 (1.0)	0	2 (1.4)
CCG/CCA	0	1 (0.64)	0	1 (0.6)	0	1 (0.7)
p	0.035*		0.171		0.407	
Haplotype						
TCG/CCA	6	23				
Others	209	249				
p	0.015		0.01			
OR	3.22		OR# 3.676			
	(95% CI = 1.28 - 8.05)		(95% CI = 1.326-10.192)			

* P < 0.05, OR# adjusted for age, gender, skin color and smoke habit.

References

1. Ahuja SK, Shetty A, Tiffany HL, Murphy PM. Comparison of the genomic organization and promoter function for human interleukin-8 receptors A and B. *J Biol Chem.* 1994; 269: 26381-9.
2. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000; 67: 444-61.
3. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 1998; 392: 565-568.

4. Barnes PJ. Genetics and pulmonary medicine: 9. Molecular genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1999; 54: 245-252.
5. Bergström J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*. 2004; 92:1-8.
6. Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F. Functional genes polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res*. 2005; 12: 1149-1153.
7. Breunis WB, Biezeveld MH, Geissler J, Kuipers IM, Lam J, Ottenkamp J. Polymorphisms in chemokine receptor genes and susceptibility to Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol*. 2007; 150: 83-90.
8. Brown EE, Fallin D, Ruczinski I, Hutchinson A, Saats B, Vitale F. Associations of classic Kaposi sarcoma with common variants in genes that modulate host immunity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15: 928-934.
9. Bulman JS, Osborn JF. Measuring diagnostic consistency. *Br Dent J*. 1989; 166: 377-381.
10. Campa D, Hung RJ, Mates D, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P. Lack of association between -251 T>A polymorphism of IL8 and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkes Prev*. 2005; 14: 2457-2458.
11. Dini EL, Castellanos RA. CPITN: time and cost estimates for periodontal prevention and treatment procedures. *Braz Dent J*. 1995; 6: 53-8.

12. Duymaz-Tozkiç J, Yilmaz V, Uyar FA, Hajeer AH, Saruhan-Direskeneli G, Gul A. Polymorphisms of the IL-8 and CXCR2 genes are not associated with Behçet's disease. *J Rheumatol*. 2005; 32:93–97.
13. Giachino D, van Duist MM, Regazzoni S, Gregori D, Bardessono M, Salacone P, et al. Analysis of the CARD15 variants R702W, G908R and L1007fs in Italian IBD patients. *Eur J Hum Genet*. 2004;12: 206-12.
14. Graves DT. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clin Infect Dis*. 1999; 28: 482-90.
15. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol*. 1994; 65:260-267.
16. Gupta M, Song P, Yates CR, Meibohm B. Real-time PCR-based genotyping assay for CXCR2 polymorphisms. *Clin Chim Acta*. 2004; 341: 93-100.
17. Hafajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994; 5: 78-111.
18. Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalized early onset periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001; 28: 430-436.
19. Irwin CR, Myrillas TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Bucal Dis*. 1998; 4:43–7.

20. 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; 404: 159-162.
21. Kato H, Tsuchiya N, Tokunaga K. Single nucleotide polymorphisms in the coding regions of human CXC-chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CXCR3. *Genes Immun*. 2000; 1: 330-7.
22. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*. 1997; 14: 33-53.
23. Lee EB, Kim JY, Zhao J, Park MH, Song YW. Haplotype association of IL-8 gene with Behçet's disease. *Tissue Antigens*. 2006; 69: 128-132.
24. Markow T, Hedrick PW, Zuerlein K, Danilovs J, Martin J, Vyvial T, et al. HLA polymorphism in the Havasupai: evidence for balancing selection. *Am J Hum Genet*. 1993; 53: 943-52.
25. Massada MP, Person R, Kenny JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and 1-beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1990; 25: 156-63.
26. Miles SA, Rezai AR, Salazar-Gonzales JF, Vander Meyden M, Stevens RH, Logan DM, et al. AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 4068-4072.

27. Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi SA, Costa JE, Gomes RS, et al. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol.* 2007;148: 119-126.
28. Morris SW, Nelson N, Valentine MB, Shapiro DN, Look AT, Kozlosky CJ, et al. Assignment of genes encoding human interleukin-8 receptor types 1 and 2 and an interleukin-8 receptor pseudogene to chromosome 2q35. *Genomics,* 1992; 14: 685-91.
29. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 284: L566-L577.
30. Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science.* 1991; 253: 1280-1283.
31. National Center for Biotechnology Information. NCBI's Entrez system [cited 2008 Jan 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>.
32. Ozawa A, Tada H, Tamai R, Uehara A, Watanabe K, Yamaguchi T, et al. Expression of IL-2 receptor and chains by human gingival fibroblasts and up-regulation of adhesion to neutrophils in response to IL-2. *J J Leukoc Biol.* 2003; 74: 352 – 359.
33. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 1976; 34: 235-249.

34. Peres MA, Antunes JLF, Boing AF, Peres KG, Bastos JLD. Skin colour is associated with periodontal disease in Brazilian adults: a population-based bucal healthy survey. *J Clin Periodontol*. 2007; 1-6.
35. 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.
36. Qiu Y, Zhu J, Bandi V, Atmar RL, Hattotuwa K, Guntupalli KK, et al. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 8: 968-75.
37. 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 crytogenic fibrosing alveolitis. *Arthr Rheum*. 2000; 43: 1633-1640.
38. Rezende VB, Barbosa F Jr, Montenegro MF, Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. An interethnic comparison of the distribution of vitamin D receptor genotypes and haplotypes. *Clin Chim Acta*. 2007; 384: 155-9.
39. Santamaria Babi LF, Moser B, Perez Soler MT, Moser R, Loetscher P, Villiger B, et al. The interleukin-8 receptor B and CXC chemokines can mediate transendothelial migration of human skin homing T cells. *Eur J Immunol*. 1996; 26: 2056-2061.
40. SAS Institute Inc. SAS OnlineDoc 9. Cary, NC: SAS Institute, Inc. 2002. Versão 9.0.

41. 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.
42. Schenkein HA. Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the climb worth the view? *Periodontol 2000*. 2002; 30: 79-90.
43. Schneider S, Roessei D, Excoffier L. ARLEQUIN ver. 2000: software for population genetics data analysis. Geneva, Switzerland. University of Geneva, 2000 [cited 2007 Aug 10]. Available from: <http://anthro.unige.ch/software/arlequin/>
44. Sham PC, Curtis D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet*. 1995; 59: 97-105.
45. Sprenger H, Lloyd AR, Lautens LL, Bonner TI, Kelvin DJ. Structure, genomic organization, and expression of the human interleukin-8 receptor B gene. *J Biol Chem*. 1994; 269: 11065-72.
46. Strieter RM. Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 283: L688-689.
47. Susin C, Valle P, Opperman RV, Haugejorden O, Albandar JM. Occurrence and risk indicators of increased probing depth in an adult Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 123-129.
48. Trevilatto PC, Line SRP. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000; 18:6-9.

49. U.S. National Institutes of Health. National Cancer Institute. SNP500Cancer project [cited 2008 Jan 19]. Available from: <http://snp500cancer.nci.nih.gov>.
50. Van Dyke TE. Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis. *Periodontol 2000*. 2007; 45: 10–13.
51. Viana AC, Kim YJ, Cirelli JA, Orrico SP, Curtis, KC, Cano VP, et al. A novel PCR-RFLP assay for the detection of the single nucleotide polymorphism at position +1440 in the human CXCR2 gene. *Biochem Genet*. 2007; 45:737-741.
52. Yamazaki K, Nakajima T, Gemmel E, Polak B, Seymour GJ, Hara K. IL-4 and IL-6 producing cells in human periodontal disease tissue. *J Bucal Pathol Med*. 1994; 23: 347-353.
53. Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y, Gemmell E, Seymour GJ, Hara K. Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. *Bucal Microbiol Immunol*. 1997; 12: 281-287.
54. Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2007; 43: 102-132.

Considerações Finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A periodontite é uma doença inflamatória crônica, de caráter multifatorial, na qual microorganismos gram-negativos atuam como importante fator etiológico³⁰. Este desafio microbiano estimula a resposta do hospedeiro gerando um processo inflamatório, que na busca de controlar a doença, acaba causando danos teciduais como perda de inserção conjuntiva e de suporte ósseo alveolar^{24,61}. Contudo, esse processo não é idêntico em todos os indivíduos, o que sugere a influência de outros fatores na suscetibilidade à periodontite. Dentre eles, pode-se destacar variações genéticas em genes de citocinas inflamatórias, bem como de seus receptores.

Há que se considerar que mesmo vários estudos tendo associado polimorfismos genéticos com suscetibilidade à doenças inflamatórias^{10,11,43} e doença periodontal^{9,40,75,76,88}, não se deve ignorar que alguns deles apresentaram deficiências em seu desenho experimental, como um número amostral baixo, além de critérios discutíveis para classificar os sujeitos como pertencente ao grupo controle ou doente.

O presente trabalho foi o primeiro a avaliar se existe associação entre os polimorfismos do gene *CXCR2* e suscetibilidade à periodontite. Para a investigação da frequência genotípica da população estudada foram utilizadas as técnicas de SSP- PCR para os polimorfismos +785(C/T) e +1208(T/C)⁶⁵ e a técnica de PCR-RFLP para o locus +1440(G/A)⁸⁹. Esta última, desenvolvida pelo presente grupo de pesquisa e validada por sequenciamento, mostrou ser uma metodologia

simples, reprodutível e eficaz. A principal vantagem do método da PCR-RFLP desenvolvido neste trabalho é que este pode ser realizado em qualquer laboratório de Biologia Molecular com o mínimo de infra-estrutura, como os de países em desenvolvimento ou que não tenham muitos recursos financeiros. Uma metodologia por PCR em Tempo Real, desenvolvida por Gupta et al.²⁷ para genotipar os mesmos loci investigados no presente estudo, apesar de não testada por nós, parece ser bastante interessante, principalmente por não necessitar que géis sejam confeccionados posteriormente. Entretanto, tal método só é viável para grupos de pesquisadores que possam contar com tal equipamento e que disponham de um bom montante de recursos financeiros, pois o termociclador e os reagentes para PCR em Tempo Real são mais caros do que os convencionais.

Variações na sequência do DNA causam mudanças fenotípicas por meio de diversos mecanismos como alterações na codificação da sequência proteica, ou na regulação gênica, envolvendo inclusive o processamento do RNAm³⁶. Dentre os polimorfismos aqui estudados, as variantes genéticas +1208(T/C) e +1440(G/A) do gene *CXCR2* estão localizadas na região 3' não traduzida do exon e têm a capacidade de alterar o processamento, estabilidade e tradução do RNAm^{2,81}. Estudos funcionais sugerem que *CXCR2* ativa fibroblastos indiretamente pelo recrutamento de células T⁷¹, um processo semelhante ao observado no sarcoma de Kaposi¹¹. Além disso, tem sido sugerida a utilização de estudos funcionais com polimorfismos que estejam atuando de forma conjunta (*cis-acting*). Estes tipos de polimorfismos afetam a expressão gênica, o processamento e a tradução do RNAm, podendo levar a

identificação de biomarcadores para diagnóstico e melhora das terapias de tratamento de doenças⁹⁰. Contudo, não foram encontrados estudos investigando a relação de polimorfismos no gene *CXCR2* com a influência na expressão da respectiva proteína, ou se estes polimorfismos podem modificar a capacidade do receptor em ligar-se à IL-8.

Outro fator observado foi a predominância de indivíduos heterozigotos na população estudada para os três polimorfismos no gene *CXCR2*, o que também foi relatado em outras populações^{27,65}. Considerando o polimorfismo +1440(G/A), não foram encontrados indivíduos com o genótipo GG, o qual foi também observado em baixa frequência numa população caucasiana avaliada no projeto SNP500Cancer (<http://snp500cancer.nci.nih.gov>). O excesso de heterozigotos, e conseqüentemente a baixa frequência ou inexistência de homozigotos é a provável causa de não ter sido observado equilíbrio de Hardy-Weinberg na nossa população para nenhum dos polimorfismos estudados. Pode-se considerar também como uma provável influência para esse resultado, o tamanho da população investigada e o fato desta ser altamente miscigenada. Durante cinco séculos a população Brasileira tem sido constituída por indivíduos de diferentes origens como Europeus (principalmente Portugueses), Africanos e Ameríndios³. Esta miscigenação traz a pertinente consideração de que no Brasil não existem raças, ou seja etnias, assim, é mais adequado categorizar os Brasileiros de acordo com a cor da pele^{62,66} do que como grupos étnicos⁵⁴. Por esse motivo, neste estudo a casuística foi categorizada de acordo com a cor da pele. Cabe

acrescentar, que na análise de cada polimorfismo deste estudo, o fator “cor da pele” não mostrou influência na associação com a Periodontite.

Um outro fator de interesse é a análise de haplótipos, pois a definição da estrutura do haplótipo, em diferentes populações, pode explicar em parte como as disparidades étnicas influenciam o risco de comprometer a saúde²¹. Quando considerada a análise de haplótipos do gene *CXCR2*, tanto no arranjo em alelos como em genótipos, houve diferenças significativas entre os grupos Controle e Periodontite, considerando a casuística total. O haplótipo TCG mostrou-se relacionado com uma chance 3,54 vezes maior de desenvolver periodontite do que todos os outros haplótipos juntos. Resultado semelhante foi observado quando os haplótipos foram organizados como genótipos, sendo que indivíduos com o haplótipo TCG/CCA pareceram ter uma chance 3,22 vezes maior de desenvolver periodontite. Estes resultados devem, contudo, ser considerados com cautela, já que são baseados na análise da amostra total, na qual foram incluídos indivíduos fumantes. Neste estudo observou-se que o fumo atuou como um fator de influência (OR=3.95; 95% CI=2.17-7.17). Assim, foi realizado um teste de regressão logística múltipla com ajuste para o hábito de fumar, idade, gênero e cor da pele para confirmar a associação dos haplótipos com a periodontite nos indivíduos estudados. Os resultados da regressão logística múltipla confirmaram a associação dos haplótipos, apresentando ainda valores mais significativos (OR[#] = 4,006; 95% IC = 1.496-10.726 – Tabela 3; OR[#] = 3.676, 95% IC = 1,326-10,192 – Tabela 4).

Cabe acrescentar que, quando foram analisados somente os indivíduos fumantes, não houve associação de haplótipos com a periodontite. Deve-se considerar que o hábito de fumar é um fator de risco à periodontite já bem estabelecido na literatura científica^{5,6,29,34}. A investigação de polimorfismos genéticos em indivíduos fumantes em relação à periodontite, pode trazer resultados interessantes como os de Meisel et al.⁵¹ e Gurkän et al.²⁸, que respectivamente, indicaram que indivíduos com determinados alelos em loci polimórficos nos genes *N-acetiltransferase 2* e *Inibidor do Ativador do Plasminogênio* poderiam ser mais suscetíveis à periodontite, principalmente se forem fumantes. Ou seja, dependendo da carga genética do indivíduo o hábito de fumar seria mais prejudicial, fato que já foi comprovado para o gene *N-acetiltransferase 2* no estudo de Cascorbi et al.¹³ que mostrou que indivíduos acetiladores rápidos e que fumam têm três vezes mais chance de desenvolverem câncer de pulmão.

No presente estudo, o primeiro a investigar polimorfismos no gene do Receptor 2 da IL-8 (*CXCR2*) em relação à periodontite, mostrou que há associação dos mesmos com a suscetibilidade à periodontite em uma população brasileira. Esse resultado reforça a importância de realizarem-se estudos que buscam marcadores genéticos de suscetibilidade ou severidade da periodontite, pois, além de propiciarem um conhecimento mais aprofundado da doença, podem contribuir para que o tratamento da periodontite se torne mais individualizado de acordo com as características genéticas do paciente.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Verificou-se a associação de haplótipos formados pelos SNPs +785(C/T), +1208(T/C) e +1440(G/A) do gene *CXCR2* com a suscetibilidade à periodontite na população brasileira estudada.

Referências

7 REFERÊNCIAS^{1*}

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Revinter; 2003.
2. Ahuja SK, Shetty A, Tiffany HL, Murphy PM. Comparison of the genomic organization and promoter function for human interleukin-8 receptors A and B. *J Biol Chem*. 1994; 269: 26381-9.
3. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*. 2000; 67: 444-61.
4. 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.
5. Bergstrom J. Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1989; 17:245-7.
6. Bergström J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*. 2004; 92:1-8.
7. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*. 1993; 64: 456-60.

^{1*} De acordo com o estilo Vancouver. Disponível em:
http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

8. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Porphyromonas gingivalis-induced inflammatory mediator profile in an ex vivo human whole blood model. *Clin Exp Immunol.* 2006; 1: 50-7.
9. Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F, et al. Functional genes polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2005; 12: 1149-53.
10. Breunis WB, Biezeveld MH, Geissler J, Kuipers IM, Lam J, Ottenkamp J, et al. Polymorphisms in chemokine receptor genes and susceptibility to Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol.* 2007; 150: 83-90.
11. Brown EE, Fallin D, Ruczinski I, Hutchinson A, Saats B, Vitale F. Associations of classic Kaposi sarcoma with common variants in genes that modulate host immunity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15: 928-34.
12. Bulman JS, Osborn JF. Measuring diagnostic consistency. *Br Dent J.* 1989; 166: 377-81.
13. Cascorbi I, Brockmüller J, Mrozikiewicz PM, Bauer S, Loddenkemper R, Roots I. Homozygous rapid arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotype as a susceptibility factor for lung cancer. *Cancer Res.* 1996; 56: 3961-6.
14. Chuntharapai A, Kim KJ. Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor. *J Immunol.* 1995; 155: 2587-94.

15. de Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito RB, Line SRP. MMP-1 promoter polymorphism: a risk factor for chronic periodontitis severity. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 153-8.
16. de Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito RB, Line SR. Analysis of the TGF- β 1 promoter polymorphism (C-509T) in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 519-23.
17. Dini EL, Castellanos RA. CPITN: time and cost estimates for periodontal prevention and treatment procedures. *Braz Dent J.* 1995; 6: 53-8.
18. Dini EL, Guimarães LO. Periodontal conditions and treatment needs (CPITN) in a worker population in Araraquara, SP, Brazil. *Int Dent J.* 1994; 44: 309-11.
19. Duymaz-Tozkir J, Yilmaz V, Uyar FA, Hajeer AH, Saruhan-Direskeneli G, Gul A. Polymorphisms of the IL-8 and CXCR2 genes are not associated with Behçet's disease. *J Rheumatol.* 2005; 32:93-7.
20. Flemmig T. Periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 32-7.
21. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science.* 2002; 296: 2225-9.
22. 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 Periodontal Res.* 2003; 38: 210-7.

23. Gemmell E, Seymour GJ. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodontol*. 1994; 28-38.
24. Genco RJ. Assessment of risk of periodontal disease. *Compendium*. 1994; 18: S678-83.
25. Gjermo P, Bellini HT, Pereira Santos V, Martins JG, Ferracyoli JR. Prevalence of bone loss in a group of Brazilian teenagers assessed on bite-wing radiographs. *J Clin Periodontol*. 1984; 11: 104-13.
26. 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.
27. Gupta M, Song P, Yates CR, Meibohm B. Real-time PCR-based genotyping assay for CXCR2 polymorphisms. *Clin Chim Acta*. 2004; 341: 93-100.
28. Gürkan A, Emingil G, Saygan BH, Cinarcik S, Atilla G, Köse T, et al. Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 genopolymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2007; 78:1256-63.
29. Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol*. 1993; 64:16-23.
30. Hafajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994; 5: 78-111.

31. Hang L, Frendeus B, Godaly G, Svanborg C. Interleukin-8 receptor knockout mice have subepithelial neutrophil entrapment and renal scarring following acute pyelonephritis. *J Infect Dis.* 2000; 182: 1738–48.
32. Hatsushika K, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Kanzaki M, Takano S, et al. Transforming growth factor-beta (2) polymorphisms are associated with childhood atopic asthma. *Clin Exp Allergy.* 2007; 37: 1165-74.
33. Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor- β promoter polymorphism in allergies and asthma. *Am J Resp Crit Care Med.* 1998; 158: 1958-62.
34. Ismail AI, Burt BA, Eklund SA. Epidemiologic patterns of smoking and periodontal disease in the United States. *J Am Dent Assoc.* 1983; 106: 617–21.
35. Johnson AD, Wang D, Sadee W. Polymorphisms affecting gene regulation and mRNA processing: broad implications for pharmacogenetics. *Pharmacol Ther.* 2005; 106: 19-38.
36. Johnson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. *J Dent Educ.* 2001; 4: 313-21.
37. Jones SA, Wolf M, Qin S, Mackay CR, Baggiolini M. Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93: 6682-6.

38. 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; 404: 159-62.
39. Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14: 430-49.
40. 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.
41. Kulke R, Bornscheuer E, Schluter C, Bartels J, Rowert J, Sticherling M, et al. The CXC receptor 2 is overexpressed in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*. 1998. 110: 90-4.
42. Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedachi 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; 3: 370-9.
43. Lee EB, Kim JY, Zhao J, Park MH, Song YW. Haplotype association of IL-8 gene with Behçet's disease. *Tissue Antigens*. 2006; 69: 128-32.
44. Lee J, Horuk R, Rice GC, Bennett GL, Camerato T, Wood WI. Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *J Biol Chem*. 1992; 267: 16283-7.
45. Leonard EJ, Yoshimura T. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 (interleukin-8)). *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990; 2: 479-86.

46. Lin CY, Lin CC, Hwang B, Chiang B. Serial changes of serum interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha among patients with Kawasaki disease. *J Pediatr.* 1992; 121: 924-6.
47. Linden GJ, Mullally BH, Freeman R. Stress and the progression of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1996; 23:675-80.
48. Matheson MC, Ellis JA, Raven J, Walters EH, Abramson MJ. Association of IL8, CXCR2 and TNF- α polymorphisms and airway disease. *J Hum Genet.* 2006; 51: 196-203.
49. McKusick VA, Hopkins J. Online Mendelian Inheritance in Man. OMIM. National Center for Biotechnology Information. NCBI [cited 2008 Jan 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM&itool=toolbar>
50. Mealey BL. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. *Compend Contin Educ Dent.* 2000; 11: 943-6.
51. Meisel P, Timm R, Sawaf H, Fanghänel J, Siegmund W, Kocher T. Polymorphism of the N-acetyltransferase (NAT2), smoking and the potential risk of periodontal disease. *Arch Toxicol.* 2000; 74: 343-8.
52. 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.
53. Mihara K, Smit MJ, Krajnc-Franken M, Gossen J, Rooseboom M, Dokter W. Human CXCR2 (hCXCR2) takes over functionalities of its murine homolog in hCXCR2 knockin mice. *Eur J Immunol.* 2005; 35: 2573-82.

54. Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi SA, Costa JE, Gomes RS, et al. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol.* 2007; 148: 119-26.
55. Morris SW, Nelson N, Valentine MB, Shapiro DN, Look AT, Kozlosky CJ, et al. Assignment of genes encoding human interleukin-8 receptor types 1 and 2 and an interleukin-8 receptor pseudogene to chromosome 2q35. *Genomics.* 1992; 14: 685-91.
56. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 284: L566-77.
57. Murphy PM. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. *Semin Hematol.* 1997; 34: 311-8.
58. Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science.* 1991; 253: 1280-3.
59. National Center for Biotechnology Information. NCBI's Entrez system [cited 2008 Jan 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>.
60. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9: 248-66.
61. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1991; 26: 230-42.

62. Peres MA, Antunes JLF, Boing AF, Peres KG, Bastos JLD. Skin colour is associated with periodontal disease in Brazilian adults: a population-based bucal healthy survey. *J Clin Periodontol*. 2007; 3: 1-6.
63. 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.
64. 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.
65. Renzoni E, Lympany P, Sestini P, Pantelidis P, Wells A, Black C, et al. Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXCR1 and 2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Arthr Rheum*. 2000; 43: 1633-40.
66. Rezende VB, Barbosa F Jr, Montenegro MF, Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. An interethnic comparison of the distribution of vitamin D receptor genotypes and haplotypes. *Clin Chim Acta*. 2007; 384: 155-9.
67. Richards BL, Eisma RJ, Spiro JD, Lindquist RL, Kreutzer DL. Coexpression of interleukin-8 receptors in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg*. 1997;174: 507-12.
68. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2005, 32 (Suppl 6): 108-29.

69. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Ann Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
70. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 1994; 17: 914-21.
71. Santamaria Babi LF, Moser B, Perez Soler MT, Moser R, Loetscher P, Villiger B, et al. The interleukin-8 receptor B and CXC chemokines can mediate transendothelial migration of human skin homing T cells. *Eur J Immunol*. 1996; 26: 2056-61.
72. SAS Institute Inc. SAS OnlineDoc 9, Cary, NC: SAS Institute, Inc. 2002. Versão 9.0.
73. Scarel RM. Análise de polimorfismo no gene MSX1 em indivíduos com agenesia dental [dissertação mestrado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da UNICAMP; 2000.
74. 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.
75. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SR. Investigation of IL 4 polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 341-5.

76. 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.
77. Schneider S, Roessei D, Excoffier L. ARLEQUIN ver. 2000: software for population genetics data analysis. Geneva, Switzerland. University of Geneva, 2000 [cited 2007 Aug 10]. Available from: <http://anthro.unige.ch/software/arlequin/>
78. Sfakianakis A, Barr CE, Kreutzer D. Localization of the chemokine interleukin-8 and interleukin-8 receptors in human gingiva and cultured gingival keratinocytes. *J Periodontal Res*. 2002; 37: 154-60.
79. Sham PC, Curtis D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet*. 1995; 59: 97-105.
80. Smithson A, Sarrias MR, Barcelo J, Suarez B, Horcajada JP, Soto SM, et al. Expression of interleukin-8 receptors (CXCR1 and CXCR2) in premenopausal women with recurrent urinary tract infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005; 12: 1358-63.
81. Sprenger H, Lloyd AR, Lautens LL, Bonner TI, Kelvin DJ. Structure, genomic organization, and expression of the human interleukin-8 receptor B gene. *J Biol Chem*. 1994; 269: 11065-72.
82. Stern DL. The problem of variation. *Nature*. 2000; 408: 529-31.

83. Susin C, Valle P, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Occurrence and risk indicators of increased probing depth in an adults. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 123-9.
84. 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.
85. 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.
86. Tonetti MS, Mombelli A. Early onset periodontitis. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry.* Copenhagen: Munksgaard; 1996. p. 227-257.
87. Trevilatto PC, Line SRP. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol.* 2000; 18:6–9.
88. 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.
89. Viana AC, Kim YJ, Cirelli JA, Orrico SP, Curtis KC, Cano VP, et al. A novel PCR-RFLP assay for the detection of the single nucleotide polymorphism at



- position +1440 in the human CXCR2 gene. *Biochem Genetics*. 2007; 45: 737-41.
90. Wang D, Sadée W. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). *AAPS J*. 2006; 8: E515-E520.
91. Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res*. 1996; 31: 393-407.
92. Wong CK, Ho CY, Ko FW, Chan CH, Ho AS, Hui DS, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-G, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol*. 2001; 125: 177-83.
93. Yamamoto T, Kita M, Oseko F, Nakamura T, Imanishi J, Kanamura N. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2006; 6: 554-9.
94. Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB, et al. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood*. 2007; 109: 3794-802.
95. Yu Y, Chadee K. The 3' -untranslated region of human interleukin-8 mRNA suppresses IL-8 gene expression. *Immunology*. 2001; 102: 498-505.
96. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000; 12: 121-7.

Anexos

8 Anexos

8.1 Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Comitê de Ética em Pesquisa

Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**ANÁLISE GENÉTICA EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA PERIODONTAL**", sob o protocolo nº 57/04, de responsabilidade do Pesquisador (a) **RAQUEL MANTUANELI SCAREL CAMINAGA**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAR, com validade de 03 (três) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled "**GENETIC ANALYSES IN INDIVIDUALS WITH PERIODONTAL DISEASE**", protocol number 57/04, under Dr **RAQUEL MANTUANELI SCAREL CAMINAGA**, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAR-UNESP. Approval is granted for 03 (three) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 11 de outubro de 2007.

Prof^{te} Dra Mirian Aparecida Onofre
Coordenadora

8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNESP  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

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. Fui esclarecido que a referida pesquisa tem por objetivo estudar se a carga genética da pessoa (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 açúcar 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. Fui 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. Fui 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 desistir 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
Responsável
(16) 3301-6504

Telefone do Comitê de Ética
em Pesquisa - FOAr
(16) 3301-6432/6434

Assinatura do paciente ou Responsável


Professora Responsável

Profª Dra Raquel Mantuanelli Scarel Caminaga

Protocolo CEP nº 57/04

Aprovado em Reunião de

05/10/04

Secretaria de CEP - FO/CAr.

8.3 Ficha Clínica

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: Periodonto saudável, c/ 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? _____
- Está 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__

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

Araraquara, 24 de março de 2008.

ALINE CAVALCANTI VIANA

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)