

DENISE CARLETO ANDIA

Análise de polimorfismo genético e
metilação no promotor do gene
Interleucina-8 em pacientes com
periodontite crônica e agressiva.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de Doutor
em Biologia Buco-Dental, área de concentração
em Histologia e Embriologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo

Co-Orientadora: Prof. Dra. Darcy de Oliveira Tosello

PIRACICABA

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

	Andia, Denise Carleto.
An24a	Análise de polimorfismo genético e metilação no promotor do gene <i>Interleucina-8</i> em pacientes com periodontite crônica e agressiva. / Denise Carleto Andia. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010. Orientadores: Ana Paula de Souza Pardo, Darcy de Oliveira Tosello. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Inflamação. I. Pardo, Ana Paula de Souza. II. Tosello, Darcy de Oliveira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título. (mg/fop)

Título em Inglês: Genetic polymorphism and methylation analysis in the promoter region of the *Interleukin-8* gene in the patients with chronic and aggressive periodontitis

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Inflammation

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Ana Paula de Souza Pardo, Ângela Guimarães Martins,

Paula Cristina Trevilatto, Francisco Humberto Nociti Júnior, Sergio Roberto Peres Line

Data da Defesa: 18-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 18 de Fevereiro de 2010, considerou a candidata DENISE CARLETO ANDIA aprovada.

Profa. Dra. ANA PAULA DE SOUZA PARDO

Profa. Dra. ANGELA GUIMARÃES MARTINS

Profa. Dra. PAULA CRISTINA TREVILATTO

Prof. Dr. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR

Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE

AGRADECIMENTOS

À Deus, inteligência suprema do Universo,
causa primária de todas as coisas, por permitir
o progresso contínuo de seus filhos.

À minha mãe, Neuza, por ter me recebido como sua filha. Exemplo de mulher forte, sincera e amorosa, mostrou-me os caminhos do bem, o respeito e amor ao próximo, a importância da família e da fidelidade aos meus ideais.

Ao Like, meu companheiro de sempre, impossível imaginar minha vida até aqui sem sua presença. Você é um ser iluminado, raro e especial, com uma capacidade incrível de amar. Sempre digo que é um privilégio conviver com você.

Lucas, filho querido, impossível colocar em palavras... Assim como seu nome diz, você é iluminado e, sendo assim, vai iluminando tudo ao seu redor. Amo você, incondicionalmente!!

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo, por ter me recebido como sua orientada. Serei sempre grata pela oportunidade de aprendizado, pela contribuição primorosa e imprescindível à minha formação profissional e, sobretudo, pela liberdade assistida, que só é possível quando há confiança. Obrigada por ter compartilhado comigo seus conhecimentos, respeito e dedicação à pesquisa. Mesmo quando você não achava que estava me ensinando, eu estava aprendendo.

Ao Prof. Dr. Sérgio R P Line, a porta da sua sala sempre esteve aberta às minhas dúvidas e questionamentos científicos. Obrigada pela disponibilidade, sempre!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro em forma de bolsa e à FAPESP, pelo auxílio financeiro à pesquisa.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP – UNICAMP), na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto e de seu diretor associado Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim, pela utilização das instalações.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Junior, Coordenador Geral dos Cursos de Pós- Graduação da FOP/UNICAMP.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP, Prof. Fausto Bérzin, pela disponibilidade nos momentos em que precisei.

À Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello, por ter compartilhado comigo seus infinitos e inestimáveis conhecimentos em Histologia e na arte da Docência.

Aos docentes do Departamento de Morfologia, área Histologia: Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello, Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line e Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo.

Aos docentes da área de Periodontia, por permitirem meu acesso às clínicas e aos pacientes que lá recebiam tratamento periodontal.

Aos novos amigos que fiz durante o curso de Doutorado em Biologia Buco-Dental: Marcelo, José, Liza, Nádia, Juliana, Marise, Naila, Aline, Mariana, Luciana, Gustavo, Simone, Eliene, Cidinha e Ivani. Vocês fazem deste departamento um lugar feliz e extremamente harmonioso...Dá vontade até de ficar mais...

À todos os funcionários do Departamento de Morfologia pelo auxílio quando precisei.

Às velhas amigas Fabrícia, Eliete e Liana, foi muito bom reencontrá-las!! Vocês não deveriam ficar longe da minha vida nunca!! Quando penso em vocês, as lembranças são sempre muito boas. Vou sentir saudades...

À velha amiga Karina, obrigada por suas contribuições em minha qualificação. Amizades construídas assim, tão rapidamente e tão sólidas, com certeza são por um motivo maior, que ainda não entendemos. Você merece a felicidade, nada menos do que isso. E aí, onde a gente vai almoçar hoje??

À querida Naila que, com muita paciência, sempre me ajudou nos momentos de dúvidas de laboratório, cálculos importantes e preparo de soluções.

Ao querido Renato, que tanto me auxiliou na fase inicial deste estudo, facilitando sempre o acesso aos pacientes e à coleta do material para a pesquisa.

Aos pacientes que fizeram parte desta pesquisa, sem suas permissões e colaborações nada teria seria possível.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação e da Biblioteca da FOP-UNICAMP.

Aos meus primeiros grandes incentivadores na pesquisa, Profa. Dra. Ângela Guimarães Martins e Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior:

Jam, minha irmã, trabalhar com você me fez crer na pesquisa feita com honestidade, seriedade e dedicação. Conhecer você me fez crer que verdadeiras amizades podem existir aqui, agora. É perfeitamente possível que elas aconteçam sem nenhum interesse, apenas pelo grande prazer de estar junto, pela grande afinidade. Sabemos que isso é eterno.

Chico, você me deu a primeira oportunidade na área acadêmica. Sem dúvida, estará para sempre em meu coração; essas coisas eu não esqueço, você sabe. Dez anos depois, eu olho para trás e vejo só coisas boas, como o privilégio e a honra de ter trabalhado com você.

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas”

(Antoine de Saint-Exupéry)

Nasceste no lar que precisavas,
Vestiste o corpo físico que merecias,
Moras onde melhor Deus te proporcionou, de acordo com teu adiantamento.
Possuis os recursos financeiros coerentes com as tuas necessidades,
Nem mais, nem menos, mas o justo para as tuas lutas terrenas.
Teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a tua
realização.
Teus parentes e amigos são as almas que atraíste, com tua própria afinidade.
Portanto, teu destino está constantemente sob teu controle.
Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas, expulas e modificas tudo aquilo
que te rodeia a existência.
Teus pensamentos e vontade são a chave de teus atos e atitudes,
São as fontes de atração e repulsão na tua jornada vivência.
Não reclames nem te faças de vítima, antes de tudo, analisa e observa.
A mudança está em tuas mãos.
Reprograma tua meta, busca o bem e viverás melhor.
Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
Qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

A Doença Periodontal ou Periodontite é uma afecção complexa e multifatorial, resultante da interação dos mecanismos de defesa do hospedeiro com as espécies bacterianas da placa. Estudos em animais e humanos indicam que fatores genéticos e epigenéticos podem modificar a resposta inflamatória e imune, afetando a experiência da periodontite. Constitutivamente expressa por células epiteliais, a quimiocina Interleucina-8 (IL-8) participa ativamente da resposta inflamatória do hospedeiro, frente ao desafio bacteriano, por sua habilidade em mediar e ativar a migração de neutrófilos. A proposição deste estudo foi investigar aspectos epigenéticos (metilação), genéticos (polimorfismo) e os níveis de transcritos gênicos no promotor do gene *IL8* em pacientes com periodontite crônica e agressiva. O primeiro capítulo relata a investigação sobre o *single-nucleotide polymorphism* (SNP) rs4073 do gene *IL8* e sua relação com a periodontite crônica, observando também os níveis de mRNA IL-8 nos tecidos controles e nos acometidos pela doença. O SNP rs4370 foi detectado e analisado por PCR-RFLP em 289 amostras de DNA genômico de pacientes controles (108) e com periodontite crônica generalizada (181). A expressão relativa do mRNA da IL-8 (12 pacientes controles x 12 periodontite) foi investigada utilizando PCR quantitativa para a detecção dos níveis de transcritos gênicos. As análises dos resultados foram ajustadas pelo modelo de regressão logística multivariada e uma associação estatisticamente significativa da periodontite com o genótipo TA ($p=4.78 \times 10^{-3}$) e com a idade ($p=4.32 \times 10^{-7}$) foi encontrada. Observou-se também um aumento da frequência do alelo A no grupo doente. Além disso, os níveis mais altos de produção de mRNA da IL-8 foram encontrados no grupo periodontite, principalmente nos indivíduos que apresentaram o genótipo TA. Esta diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa ($p=0.03$). Concluiu-se que o SNP rs4073 pode estar associado à periodontite crônica generalizada, em indivíduos brasileiros não fumantes, já que se observou um aumento na produção dos transcritos de mRNA da IL-8, na presença da inflamação periodontal. Esta significância foi estatisticamente significativa mesmo após as correções para fatores como idade, gênero e etnia. O segundo capítulo investigou o mesmo SNP em famílias acometidas pela

periodontite agressiva. PCR-RFLP foram utilizadas para a análise do genótipo da *IL-8* em 13 famílias e para a investigação da frequência e do padrão de transmissão do alelo A, considerado o alelo de risco. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT). Não houve associação do polimorfismo com a doença, com uma transmissão equilibrada entre os alelos (T: $Z=1,213$, $p=0,2252$; A: $Z=-1,213$, $p=0,2252$) e frequência similar entre eles (T:52% e A:48%). Concluiu-se que o padrão de transmissão do alelo A e a combinação dele em genótipos são equilibrados, tanto em indivíduos com periodontite agressiva generalizada quanto nos controles. O terceiro capítulo relata a investigação do padrão de metilação no promotor do gene *IL8* das células do epitélio oral em pacientes com periodonto saudável (controles) e nos acometidos pela periodontite agressiva. Para tanto, DNA genômico de células epiteliais orais de 37 indivíduos apresentando periodontite agressiva generalizada e de 37 pacientes controles foram purificados, modificados pelo bissulfito de sódio e submetido à técnica de PCR-MSP. A diferença no padrão de metilação entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p=0.016$; χ^2 test), sendo que a condição não metilada foi encontrada em 62% dos indivíduos controles, enquanto que esta frequência esteve presente em 86.5% no grupo com periodontite. Concluiu-se, portanto, que os indivíduos com periodontite agressiva generalizada apresentaram um padrão de hipometilação nos dinucleotídeos CpGs analisados no promotor *IL8*.

Palavras-chave: periodontite, *IL8*, polimorfismo genético, metilação do DNA.

ABSTRACT

Periodontitis is a complex and multifactorial disease that results from the interaction of the host defense mechanisms with the plaque microorganism. Studies of animals and humans indicate that genetic factors could impair inflammatory and immune responses in general, affecting periodontitis experience specifically. Constitutively produced by the epithelial cells, the Interleukin-8 (IL-8) chemokine is important in the regulation of the inflammatory response for its ability to mediate the activation and migration of neutrophils. Therefore, the aim was to investigate the epigenetic (methylation) and genetic (polymorphism) aspects and RNA expression of the *IL8* gene promoter in chronic and aggressive periodontitis patients. The first chapter investigated the association of the *single-nucleotide polymorphism* (SNP) rs4073 and chronic periodontitis; in addition, the levels of IL-8 mRNA in gingival tissue were observed. The *IL8* SNP rs4370 was detected and analyzed by PCR-RFLP assay in 289 genomic DNA samples of control (108) and generalized chronic periodontitis (181); analyses were adjusted by the multivariate logistic regression modeling. Total RNA from gingival cells was isolated (12 control subjects x 12 periodontitis patients) and real-time PCR performance was used to detect the levels of IL-8 mRNA. Analysis points to a statistical significant association of the generalized chronic periodontitis with TA genotype ($p=4.78 \times 10^{-3}$) and age ($p=4.32 \times 10^{-7}$); moreover, the results showed an increase in the frequency of the A allele in the diseased group. Farther, the higher levels of the IL-8 mRNA were found in the chronic PD group, mainly in individuals who presented the TA genotype; the difference amongst the groups was statistically significant ($p=0.03$). The *IL8* SNP rs4073 is associated with generalized chronic periodontitis in non-smoker Brazilian subjects, since it was observed an increase in the production of IL-8 mRNA transcripts, in the presence of the periodontal inflammation. Importantly, this significance was preserved even after correcting for factors such as age, gender and ethnicity. The second chapter investigated the frequency and the transmission pattern of the A allele of the *IL8* SNP rs4370 within Brazilian families affected with generalized aggressive. The polymorphism was detected and analyzed by PCR-RFLP assay in 13 nuclear families. The statistical analysis was performed using the transmission disequilibrium test (TDT). There was no statistically significant association of the *IL8* SNP

rs4370 with generalized aggressive periodontitis, with a balanced transmission between the alleles (allele T: $Z=1.213$, $p=0.2252$; allele A: $Z=-1.213$, $p=0.2252$). In addition, there is also similar allele frequency (allele T: 52% and allele A: 48%). The transmission pattern of the A allele and its genotype combination are balanced, in generalized aggressive individuals and in the control subjects. The third chapter aimed to observe the DNA methylation status in the *IL8* gene promoter in cells of the oral epithelium of control subjects and to compare it with that of subjects affected by generalized aggressive periodontitis. Genomic DNA from epithelial oral cells of 37 generalized aggressive periodontitis patients and 37 controls were purified, modified by sodium bisulphite and submitted by PCR-MSP technique. Subjects who presented generalized aggressive periodontitis had a higher frequency of hypomethylation of the *IL8* gene promoter than those controls (86.5% in the generalized aggressive periodontitis group versus 62% in the control group; $p=0.016$; χ^2 test). The frequency of the individuals in the control group who presented only the unmethylated status was about 62%, while there was an increase in this frequency in the generalized aggressive periodontitis group to 86.5%. It was found a marked hypomethylated status in the subjects who presented generalized aggressive periodontitis, comparing to the controls, in the promoter region analyzed of the *IL8* gene.

Key words: methylation, polymorphism, *IL8*, periodontitis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-meC – grupo metil ligado ao carbono 5 da base nitrogenada Citosina, formando 5metilcitosina

% - por cento

χ^2 - qui-quadrado

°C - grau celsius

µg - micrograma

µL - microlitros

µM - micromolar

A – Adenina

AgP – Aggressive periodontitis

C - Citosina

CAL - clinical attachment loss

cDNA – Complementary deoxyribonucleic acid/DNA complementar

CH₃ – Grupamento metil

CpA - citosina/ligação fosfodiéster/adenina

CpC - citosina/ligação fosfodiéster/citosina

CpG - citosina/ligação fosfodiéster/guanina

CpT - citosina/ligação fosfodiéster/timina

CrP – Chronic periodontitis

DNA - Deoxyribonucleic acid/ácido desoxirribonucleico

DNMTs - DNA methyltransferases

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

G - Guanina

GAPDH - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

h – hora

HIV – Human immunodeficiency virus

IL-1 β - Interleukin-1 Beta

IL-8 – Interleukin-8

LPS – lipopolysaccharide

MBP - *Methyl binding proteins*

MeCP - *Methyl cytosine binding protein*

min - minuto

mL - mililitro

mm - milímetro

MMP-3 – metaloproteinase da matriz 3

RNA - ribonucleic acid

mRNA - Messenger ribonucleic acid/ácido ribonucléico mensageiro

OD - densidade óptica

pb – pares de bases

PCr – Periodontite Crônica

PAgr – Periodontite agressiva

PCR - Polymerase chain reaction/reação em cadeia da polimerase

PCR-MSP - Methylation-specific polymerase chain reaction

PCR-RFLP - Restriction fragment length-specific polymerase chain reaction

PD - Periodontal disease

PPD - probing pocket depth

RNA_m – RNA mensageiro

RPM - rotações por minuto

rs4073 - Reference sequence number from the NCBI's Entrez system

RT-PCR - Reação de transcrição reversa em tempo real

SAM - S-adenosilmetionina

SNP – Single nucleotide polymorphism

TBE - Tampão tris-borato-EDTA (ácido diamino tetracético)

TE – Tris/EDTA

TNF - tumor necrosis factor

Tris- tris (hydroxymethyl) aminomethane

U - unidade

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1: <i>IL8 gene promoter polymorphism may contribute to chronic periodontitis</i>	11
CAPÍTULO 2: <i>Genetic analysis of the IL8 -251T/A polymorphism in families with aggressive periodontitis</i>	26
CAPÍTULO 3: <i>DNA methylation status of the IL8 gene promoter in aggressive periodontitis</i>	38
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXOS	60

INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal e a Interleucina-8

A doença periodontal ou periodontite é uma afecção complexa e multifatorial, resultante da interação dos mecanismos de defesa do hospedeiro com as espécies bacterianas da placa. A maioria dos casos de periodontite é causada por um pequeno número de espécies bacterianas, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Este número limitado de bactérias específicas é essencial para o início da doença, porém, insuficiente para explicar totalmente a progressão e o grau de gravidade de certas periodontites (Page *et al.* 1997). As principais características clínicas da doença, como inflamação gengival, formação de bolsa periodontal e perda de inserção clínica e óssea (Flemmig 1999) são resultantes das interações entre a resposta do hospedeiro e as espécies bacterianas.

A periodontite acontece em formas diferentes, sendo descrita como periodontite crônica ou periodontite agressiva basicamente. Estas são caracterizadas por mecanismos elementares, sendo que as características histopatológicas, ultraestruturais e vias de destruição tecidual, assim como a cicatrização e regeneração são bastante similares, se não idênticas. A periodontite crônica (PCr) é caracterizada como uma forma de periodontite que, normalmente, tem seu início após os 35 anos de idade do indivíduo. A reabsorção óssea progride lentamente e predominantemente na direção vertical, podendo ter períodos de progressão rápida e, portanto, velocidade de progressão variada (Flemmig 1999). Afeta um variado número de dentes, além de ser modificada ou associada a doenças sistêmicas, como diabetes ou ainda a fatores como o consumo de cigarros e estresse emocional (Consensus Report). A periodontite agressiva (PAgr), por outro lado, usualmente afeta jovens saudáveis e promove uma rápida perda de inserção clínica e destruição óssea (Armitage 1999). Caracterizada pela agregação familiar (Tonetti & Mombelli 1999), a PAgr também parece ser influenciada por doenças sistêmicas, fatores microbiológicos e

ambientais, como por exemplo, o hábito de fumar, higiene oral, estresse e estilo de vida (Kinane, Shiba & Hart 2005). Porém, a característica de agregação familiar de seus casos indica que fatores genéticos podem ser importantes na susceptibilidade à doença (Tonetti & Mombelli 1999). A história familiar é considerada um dos principais critérios de diagnóstico na atual classificação da PAgr, sendo que o exame familiar pode ser usado como uma ferramenta preventiva de diagnóstico (Nibali et al. 2009).

Resultados de estudos científicos sugerem que há fortes evidências da existência de uma base genética para a maioria das doenças humanas, inclusive para a periodontite, justificando, assim, respostas individuais diferentes a um desafio ambiental comum. Fatores genéticos que influenciam e modificam a resposta imuneinflamatória do hospedeiro ao desafio bacteriano são os principais determinantes da susceptibilidade à periodontite e podem explicar os níveis de progressão e severidade da doença em certos indivíduos (Page *et al.* 1997), estando assim intimamente associados ao fenótipo clínico. A degradação dos tecidos periodontais está estreitamente relacionada a uma gama de eventos biológicos que incluem a complexa rede de citocinas pró e anti-inflamatórias, fatores de crescimento e enzimas. Estudos em animais e humanos indicam que fatores genéticos podem modificar a resposta inflamatória e imune, afetando a experiência da periodontite (Kinane, Shiba & Hart 2005). Vários genes são responsáveis pela expressão de moléculas que participam e conduzem os mecanismos imuneinflamatórios do hospedeiro durante o curso da periodontite, sendo que um deles é o gene *Interleucina-8 (IL8)*.

O gene *IL8*, localizado no cromossomo 4q12-q13, possui quatro éxons que codificam uma pequena proteína que, em sua forma madura e totalmente processada, possui 72 aminoácidos, denominada IL-8 (Remick 2005). A IL-8 é uma citocina que possui propriedades quimiotáticas, ou seja, induz a migração direta das células de defesa do sangue para o local da inflamação (Remick 2005). Constitutivamente expressa por uma variedade de células, incluindo macrófagos, monócitos, fibroblastos e células epiteliais, esta quimiocina é a principal molécula atrativa de neutrófilos (Standiford *et al.* 1990). Múltiplos estímulos podem levar a célula a produzir IL-8, incluindo bactérias, lipopolissacarídeos (LPS) e citocinas inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α .

(TNF- α) (Remick 2005), importantes fatores dentro do processo de início e progressão da periodontite. Alta quantidade de proteína e mRNA da IL-8 tem sido encontrada em tecido gengival e fluido gengival de indivíduos com periodontite crônica, o que nos leva a acreditar na importância desta citocina no desenvolvimento e na manutenção da periodontite crônica (Yucel-Lindberg & Brunius 2006). A IL-8, portanto, possui papel de destaque na regulação da resposta imuneinflamatória do hospedeiro, frente ao desafio bacteriano.

Polimorfismos genéticos e polimorfismo genético no gene *IL8*

Fatores genéticos podem afetar o prognóstico da periodontite e polimorfismos em genes de proteínas que estão envolvidas com a periodontite despertaram interesse de estudo nos últimos anos e assim vêm sendo investigados. Polimorfismos são sequências de DNA específicas, que ocorrem normalmente na população humana em duas ou mais versões levemente diferentes. Algumas vezes ocorrem em apenas um único nucleotídeo e, neste caso, são denominados SNPs – *single-nucleotide polymorphisms*. Os SNPs são pontos na sequência do genoma onde uma grande fração da população humana possui um nucleotídeo, enquanto outra grande fração possui outro (Alberts 2004). Por definição, polimorfismos são regiões variadas onde uma das formas está presente em pelo menos 1% da população, sendo que, de fato, alguns polimorfismos já sabidamente relacionados à doença periodontal ocorrem em frequências muito mais altas, onde um alelo polimórfico pode apresentar frequência de 20% a 50% na população (Kinane, Shiba & Hart 2005). Alterações genéticas podem modificar os níveis de transcrição de um gene, ou seja, o polimorfismo pode ocorrer, não apenas em uma região que codifica uma proteína (éxon), como também nas regiões não codificadoras (íntron e região promotora do gene) e, portanto, influenciar a quantidade ou composição da proteína produzida pelo gene. O SNP rs4073, localizado no promotor do gene *IL8*, já foi descrito na literatura associado a várias doenças (Garza-Gonzales *et al.* 2007, Hull & Thomson & Kwiatkowski 2000, Kamali-

-Sarvestani & Aliparasti & Atefi 2007, Goverdhan *et al.* 2008, Vairaktaris *et al.* 2007, McCarron *et al.* 2002). Os nucleotídeos que se alternam são a adenosina (A) e a timina (T), portanto, a população pode se dividir em TA (heterozigoto), AA (homozigoto) ou TT (homozigoto). As análises mostram que o alelo A é considerado o alelo de risco, pois eleva os níveis de transcritos de IL-8 após a estimulação com LPS (Hull *et al.* 2001). Em populações africanas ou afroamericanas, o alelo A é encontrado em aproximadamente 75% da população, enquanto que nos europeus, essa frequência cai para 36% (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=4073). Não foram encontrados dados com relação à população brasileira, que é uma população bastante miscigenada e, portanto, bastante peculiar.

Metilação na molécula de DNA

O projeto Genoma Humano consistiu em um esforço internacional com o objetivo de mapeamento do genoma humano e a identificação de todos os nucleotídeos que o compõem. Apesar do enorme avanço em conhecimento que o projeto Genoma Humano trouxe, ele não pôde responder a todas as perguntas que inicialmente se acreditava ser capaz. Um dos motivos deve residir no fato de que alterações químicas ocorrem na cromatina e não alteram a sequência de bases nitrogenadas, sendo chamadas de alterações epigenéticas. Dentre as alterações epigenéticas, a única que ocorre no DNA é a metilação.

A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH_3) é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina que geralmente precede uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação de uma família de enzimas que recebem o nome de DNA metiltransferases (DNMT) (Figura 1).

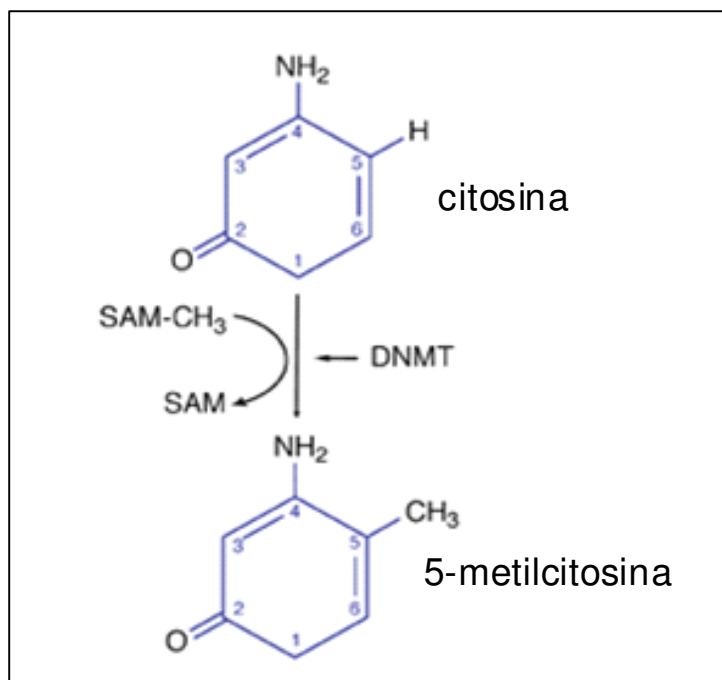


Figura 1. Esquema do processo de formação da 5-Metilcitosina (5-MeC) pela DNA metiltransferase. Fonte: Strathdee & Brown, 2002.

As DNMTs estão divididas em duas classes, ou seja, aquelas envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas do DNA (Figura 2), conhecidas como metilases de manutenção, como a DNMT1, e outro grupo responsável pela maioria dos processos de metilação *de novo*, que ocorrem em sítios sem nenhum tipo de indicação de metilação, ou seja, sem a presença de metilação prévia, como as DNMT2 e DNMT3A e DNMT3B (Bestor 2000). Os doadores de radical metil são obtidos da dieta e são principalmente o folato, a metionina, a colina e a vitamina B12 (Waterland & Jirtle 2003; Waterland 2006).

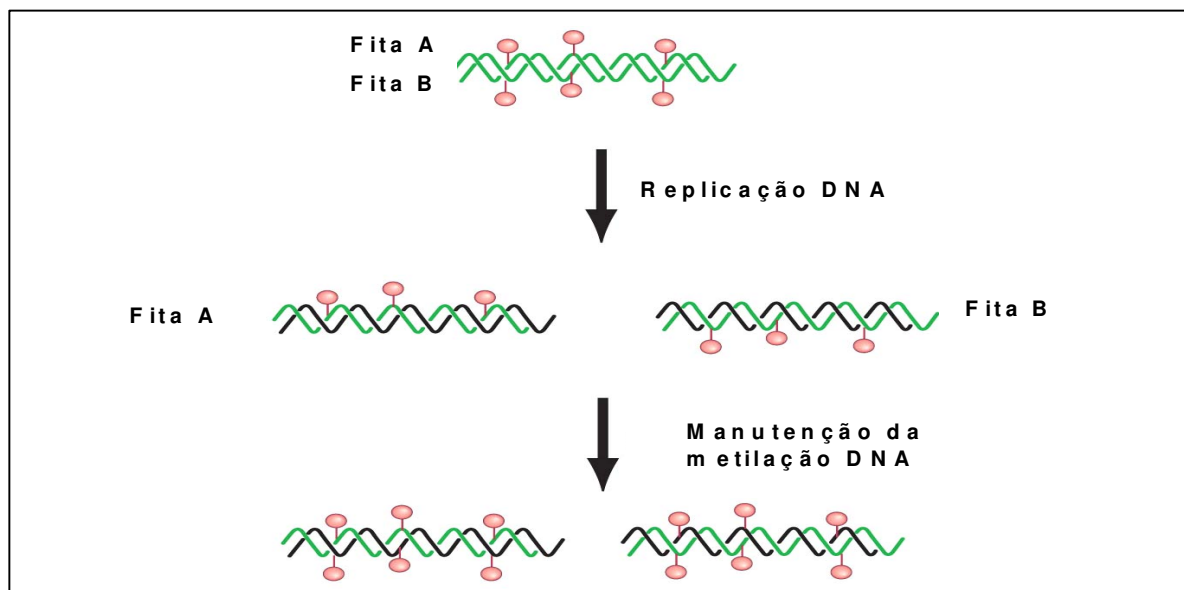


Figura 2. Esquema mostrando a aquisição de radical metil pelas fitas-filhas. Fonte: Allis *et al.*, 2006.

Há, ainda, outro grupo de enzimas responsável pela desmetilação do DNA. O processo denominado desmetilação ativa envolve as desmetilases e parece ser necessário para ativar genes específicos ou apagar a marca epigenética durante o desenvolvimento ou em resposta a perturbações ambientais. A desmetilação ainda pode ser passiva, quando não há envolvimento de desmetilases e ocorre quando a manutenção pelas metiltransferases é inativada durante o ciclo celular (Zhu 2009). Assim, o nível e padrão de 5-meC são determinados por ambos os processos de metilação e desmetilação, sendo que as enzimas envolvidas nesses processos devem estar altamente reguladas.

A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG em células diferenciadas e tem uma importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma (Feinberg & Tycko 2004). Com alta frequência de aparecimento em genomas de eucariotos (Poole *et al.* 2001), pode ser randômica ou sítio específica. Curiosamente, os pesquisadores do primeiro epigenoma, recentemente sequenciado e publicado na revista *Nature* (Lister *et al.* 2009), observaram

que, em células embrionárias indiferenciadas, a porcentagem de metilação em CpA, CpT ou CpC é alta e isto poderia estar relacionado à pluripotência destas células.

Os dinucleotídeos CpG aparecem esparsos pelos genomas eucariotos ou agrupados em regiões definidas como ilhas CpG. A literatura nos mostra que a maioria dos dinucleotídeos CpG esparsos estão metilados, ao contrário das ilhas CpG que estão desmetiladas. Estas ilhas são frequentes em regiões promotoras de certos genes, incluindo genes *housekeeping*. Definindo, “*ilhas CpG*” são regiões do DNA maior que 200 pares de base contendo aproximadamente 50% de bases C e G e com uma presença esperada de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG (Li & Dahiya 2002).

Recentes ensaios de *microarray* mostraram que 3 a 4% das ilhas CpG do genoma humano são hipermetiladas numa variedade de tecidos somáticos e isto estaria associado ao conteúdo CpG desta ilha (Weber *et al.* 2005, Shen *et al.* 2007, Weber *et al.* 2007). Assim, promotores com percentual reduzido de ilhas CpG são mais comumente vistos hipermetilados. Weber e colaboradores (2007), denominaram essas sequências com CpG reduzidas de “ilhas CpG fracas”. De acordo com esses pesquisadores um promotor denso em CpG, também chamado de “ilha CpG forte”, contém uma área de 500 pb, com razão C/G acima de 0,75 e conteúdo de CpG acima de 55%. Ilhas CpG que apresentam um ou mais parâmetros abaixo desses são chamadas de ilhas fracas. Ainda, uma ilha fraca pode ser dividida em pequena ilha CpG se apresentar parâmetros mínimos e ilha intermediária se apresentar parâmetros intermediários.

A metilação do DNA controla várias funções do genoma, como a recombinação durante meiose e mitose, controle da replicação, controle de DNAs “parasitas” que se inserem no genoma humano (ex.: DNA viral), estabilização e manutenção da expressão genética, regulação da diferenciação celular e inativação do cromossomo X, sendo essencial durante a morfogênese para que ocorra desenvolvimento normal (Wolffe & Matzke 1999; Suter *et al.* 2004). Entretanto, a aberração no padrão de metilação do promotor de um gene pode levar à perda de função deste gene e pode ser muito mais frequente que a mutação genética.

A transcrição gênica pode ser fortemente inibida pela adição de radical metil. A presença de um “capuz” metil sobre uma citosina que precede uma guanina pode inibir a ligação de fatores de transcrição que se ligam a estas regiões (Figura 3). A não-ligação de fatores de transcrição aos seus sítios específicos resulta na ausência de transcrição gênica. Padrão de hipermetilação aberrante em promotores de genes vem sendo considerado um dos principais mecanismos associados à inativação de genes, principalmente os genes supressores de tumores no câncer (Fukushige *et al.* 2009).

Proteínas chamadas MBPs (*Methyl Binding Proteins*), com afinidade pelo grupo metil, ligam-se às regiões CpGs localizadas nas regiões promotoras e impedem o acesso dos fatores de transcrição aos seus sítios (Attwood *et al.* 2002). As primeiras MBPs, isoladas no final dos anos 80 e início dos anos 90 por Bird e colaboradores, formam uma família de proteínas composta por pelo menos 5 membros, sendo que as mais estudadas são a MeCP1 e MeCP2 (*Methyl cytosine binding protein*) (Dhasarathy & Wade 2008). A MeCP1, que se liga ao grupo metil, necessita de múltiplos sítios CpG próximos para se ligar e assim promover a condensação da cromatina para a forma inativa; a proteína MeCP2 pode se ligar a apenas um simples sítio CpG, promovendo alterações na cromatina semelhantes às promovidas pela proteína MeCP1.

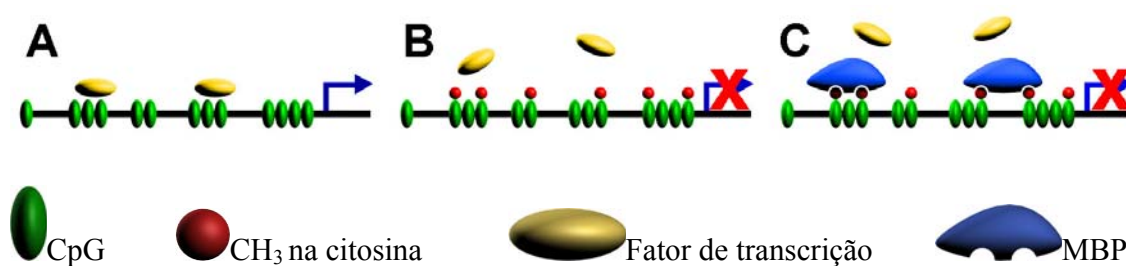


Figura 3. Mecanismo pelo qual a metilação do DNA inibe a transcrição gênica. **A.** Região promotora desmetilada permitindo a ligação dos fatores de transcrição. **B.** Metilação impedindo a ligação dos fatores de transcrição. **C.** Proteínas que se ligam à metilcitosina em ilhas CpG bloqueiam a ligação dos fatores de transcrição. Fonte: Attwood *et al.* 2002.

Aberrações epigenéticas provocam síndromes como Prader-Willi [OMIM #176270], Angelman [OMIM #105830], Beckwith-Wiedemann [OMIM #130650], Rett

[OMIM #312750] e podem predispor ao câncer (Laird 2003). Metilação no DNA é uma alteração frequente em muitos tumores humanos e tem crescido o número de genes relacionados a tumores que apresentam metilação da base citosina, em sequências ricas em CG, normalmente não metiladas. Metilação em regiões ricas em CG pode ocorrer em genes envolvidos com diferentes funções durante o desenvolvimento do câncer, como supressão do tumor (*p14*, *p15*, *p16*, *p73* e *BRCA1*), reparo do DNA (*hMLH1* e *MGMT*), invasão e metástase (*CDH1*, *ECAD*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *DAPK*) (Russo *et al.* 2005).

Além da dieta, outros fatores ambientais têm sido implicados na modulação da metilação, incluindo poluentes, tais como os íons metálicos cromo (Shiao *et al.* 2005), cádmio (Takiguchi *et al.* 2003) e níquel (Salnikow e Costa 2000), além de medicamentos (Veurink *et al.* 2005) e fungicidas (Anway *et al.* 2006).

Existe uma forte semelhança em eventos que ocorrem no câncer e na inflamação crônica, com mediadores químicos comuns aos dois processos (Valinluck e Sowers 2007b). A associação entre polimorfismos genéticos e tumores ou doenças inflamatórias crônicas tem sido exaustivamente investigada. Do mesmo modo, a associação entre alterações epigenéticas, tumores e inflamação deve ser estudada, já que estas alterações podem propiciar o desenvolvimento de um tumor, podendo também modular a inflamação. Como exemplo, a hipometilação do gene do receptor Toll-like-2 tem sido associada ao aumento da resposta pró-inflamatória, durante infecção pulmonar em pacientes com fibrose cística (Shuto *et al.* 2006) e a hipometilação do gene *MMP-3* tem sido associada com a degradação de cartilagem durante a osteoartrite (Roach *et al.* 2005).

Sabendo-se que diferenças significantes na frequência de um polimorfismo entre um grupo doente e um grupo controle é evidência de que o gene tem algum papel na determinação da susceptibilidade à doença e que alterações no padrão de metilação em genes candidatos podem alterar o padrão de expressão gênica, esta Tese de Doutorado tem como proposição:

PROPOSIÇÃO

1. Analisar a associação do SNP rs4073 com a PCr, relacionando os níveis de mRNA IL-8 nos tecidos saudáveis e nos acometidos pela doença com a presença do alelo de risco (Capítulo 1).
2. Analisar a associação do SNP rs4073 com a PAgr, investigar o padrão de transmissão do alelo A em famílias afetadas pela doença e a associação do referido alelo com a susceptibilidade à doença nestas famílias (Capítulo 2).
3. Observar o padrão de metilação no promotor do gene *IL8*, nas células do epitélio oral em pacientes não fumantes com periodonto saudável e compará-lo aos indivíduos afetados pela PAgr (Capítulo 3).

CAPÍTULO 1 - IL8 GENE PROMOTER POLYMORPHISM MAY CONTRIBUTE TO CHRONIC PERIODONTITIS.

Denise Carleto Andia¹, Naila Francis Paulo de Oliveira¹, Francisco Humberto Nociti Júnior², Sergio Roberto Peres Line¹, Ana Paula de Souza¹.

¹Department of Morphology, Division of Histology, Laboratory of Molecular Biology; School of Dentistry at Piracicaba, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

²Department of Prosthodontics and Periodontics, Division of Periodontics, School of Dentistry at Piracicaba, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

³Department of Oral Biology and Center for Craniofacial and Dental Genetics, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, USA.

Corresponding author:

Dra. Ana Paula de Souza

Department of Morphology, School of Dentistry at Piracicaba, University of Campinas.

Avenue Limeira 901,

CEP 13414-018 Piracicaba-SP, Brazil

Phone: +55 19 21065214

anapaulapardo@fop.unicamp.br

Running title: *IL8* promoter polymorphism and periodontitis.

Key words: periodontitis, polymorphism, *IL8*, genotype, allele.

Conflict of interest and source of funding statement

There are no conflicts of interest associated with this work. Andia D.C. was supported by the Capes, Brazil.

Abstract

Aim: The interleukin-8 (IL-8) chemokine is important in the regulation of the inflammatory response which is the hallmark of periodontitis; moreover, analyses of the *IL8* gene single nucleotide polymorphism (SNP) rs4370 have shown that the A allele up regulates the IL-8 levels after stimulation with lipopolysaccharide. This study investigates the association of the SNP rs4073 with chronic periodontal disease (PD).

Materials and Methods: The SNP rs4370 was detected and analyzed by standard polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay in 289 genomic DNA samples of control and chronic PD; analysis were adjusted by the multivariate logistic regression modeling. Total RNA from gingival cells was isolated using the Trizol reagent and real-time PCR performance was used to detect the levels of IL-8 mRNA and relate to the genotypes.

Results: Analysis points to a statistical significant association of the chronic PD with TA genotype and age; moreover, the results showed an increase in the frequency of the A allele in the diseased group. Farther, the higher levels of the IL-8 mRNA were found in the chronic PD group, mainly in individuals who presented the TA genotype; the difference amongst the groups was statistically significant ($p=0.03$).

Conclusions: The SNP rs4073 is associated with chronic PD, in non-smoker Brazilian subjects, since it was observed an increase in the production of IL-8 mRNA transcripts, in the presence of the periodontal inflammation. Importantly, this significance was preserved even after correcting for factors such as age, gender and ethnicity.

Introduction

Periodontal disease (PD) is a complex and multifactorial disease that results from the interaction of the host defense mechanisms with the plaque microorganisms. This interaction leads to the primary clinical features of PD, which are gingival inflammation, attachment loss, periodontal pocketing and alveolar bone loss (Flemmig 1999). The bacterial activation in the junctional epithelium initiates vascular endothelial responses that involve, primarily, neutrophil migration to the sulcus (Page et al. 1997).

Interleukin-8 (IL-8), the most potent known chemokine, is responsible for inducing chemotaxis, which is the directed migration of cells to a site of inflammation (Remick 2005). This chemokine also mediates the activation and migration of neutrophils into tissue from peripheral blood (Marshall 2005, Scapini et al. 2000). Multiple stimuli will induce the secretion of IL-8, including lipopolysaccharide, live bacteria, early proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF) and Interleukin-1 (IL-1) (Remick 2005, Yucel-Lindberg & Brunius 2006). IL-8 is relatively unique, since it may be produced early in the inflammatory response, but will persist for a prolonged period of time, for days or even weeks (Remick 2005, DeForge et al. 1992), in contrast to most other inflammatory cytokines, which are typically made and cleared during *in vivo* situations in a matter of a few hours (Remick 2005).

It is now evident that there is a genetic basis for most diseases, including PD. Evidence from classical twin studies (Michalowicz et al. 1991) suggests that genetic determinants are significant modifiers of the periodontitis phenotype (Michalowicz 1994, Hart & Kornman 1997, Schenkein 2002). Elucidation of the genetic basis of PD should permit a better understanding of disease etiology, allowing improved classification, diagnosis, and treatment. Thus, enormous efforts have been expended to identify gene polymorphisms associated with the risk for the PD (Astolfi et al. 2006, Ferreira 2008, Louropoulou et al. 2008, Park et al. 2008, Kim et al. 2009, Nibali et al. 2009).

A well-characterized *IL8* gene single-nucleotide polymorphism (SNP) at position -251T/A (rs4073 - reference sequence number from the NCBI's Entrez system) has been described and associated with several diseases as gastric cancer, bronchiolitis, breast

cancer, macular degeneration, oral squamous cell carcinoma and prostate cancer (Garza-Gonzales et al. 2007, Hull & Thomson & Kwiatkowski 2000, Kamali-Sarvestani & Aliparasti & Atefi 2007, Goverdhan et al. 2008, Vairaktaris et al. 2007, McCarron et al. 2002). Analyses have shown that the A allele up regulates IL-8 levels after stimulation with lipopolysaccharide (LPS) (Hull et al. 2000); therefore, it could be interesting to investigate the functional -251T/A polymorphism with PD. Thus, this study was designed to investigate the association of the SNP rs4073 with generalized chronic PD, attending to the levels of IL-8 mRNA in control and diseased tissue related with the respective genotypes.

Material and Methods

Study population

Subjects from the Southeastern region of Brazil were recruited from the patient pool of the Dental Clinics of the School of Dentistry at Piracicaba, State University of Campinas. This study was approved by the Ethical Committee for Research of the State University of Campinas (Protocol number 095/97), and informed consent was signed by each subject after explanations were provided. Two hundred and eight nine (289) non-smoking subjects were included in this cross-sectional study and the demographic characteristics of the study population are presented in Table 1. All subjects were in good general health and had at least 20 teeth in their mouth. Subjects did not have any of the following exclusion criteria: smoking, diseases of the oral hard or soft tissues (except caries and PD), use of orthodontic appliances, need for pre-medication for dental treatment, chronic usage of anti-inflammatory drugs, a history of diabetes, hepatitis or HIV infection, immunosuppressive chemotherapy, history of any disease known to severely compromise immune function, presence of acute necrotizing ulcerative gingivitis, or current pregnancy or lactation.

Diagnosis and classification of generalized chronic PD were performed based on the 1999 Consensus Classification of Periodontal Diseases (Armitage 1999). The diagnostic examination considered the clinical parameters and consisted of physical examination, full medical and dental history, probing pocket depth (PPD), assessment of

clinical attachment loss (CAL), tooth mobility and observation of gingival bleeding on probing and radiographic evaluation. Measurements of probing depth and attachment level were recorded at six points around each tooth. The individuals of the control group were also examined attending the same clinical parameters as used in the chronic PD group. The clinical parameters were obtained by one calibrated examiner (intraclass correlation = 0.94).

1. Control (n=108): Subjects did not show any sites with CAL and PPD $\geq$ 3 mm and bleeding in any quadrant; tooth mobility was not found; age over 25 years.
2. Generalized chronic PD (n=181): Patients with at least 30% of the sites are affected with CAL $\geq$ 5 mm; age over 35 years.

Genetic analysis

Isolation of genomic DNA

The sampling of buccal epithelial cells was performed as described by Trevilatto & Line (2000) (21). DNA was then purified by sequential phenol/chloroform extraction and salt/ethanol precipitation. DNA was dissolved in 70 ml TE buffer [10mM Tris (pH 7.8), 1mM EDTA] and its concentration estimated by measuring absorbance at 260 nm using a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Evolution 60, Madison WI, USA). DNA integrity was checked using agarose gel electrophoresis.

Polymerase chain reaction (PCR)

A fragment of 349 bp of the *IL8* gene promoter (GenBank M28130) was PCR amplified with specific primers: (forward) 5'-CATGATAGCATCTGTAATTAAGT 3' and (reverse) 5'- CTCATCTTTTCATTATGTCAGAG- 3'. PCR was carried out in a total volume of 10 μ l, containing 1 μ l genomic DNA, 1.5 μ l of each primer and 5 μ l of Go Taq Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA). The solution was incubated for 5 min. at 95°C, followed by 35 cycles of 1 min. at 95°C, 1 min. at 51°C and 1min. at 72°C, with a final extension of 72°C for 7 min.

Genotyping SNP rs4073

The restriction endonuclease digestion was prepared using a 5µl aliquot of *IL8* PCR products mixed with a 5µl solution containing 1µl 10 X NE Buffer (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, pH 7.9), 0.25µl *MfeI* (10,000 U/ml) (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) and 3.75µl sterile deionized H₂O. The solution was incubated at 37°C overnight. The A allele completes a corresponding restriction endonuclease site, while the T allele does not. The length difference of the RFLP fragments was 147bp and 55bp (TT 349bp; TA 349bp, 202bp and 147bp; AA 202bp and 147bp). Aliquots of 5µl of the RFLP products were electrophoresed on 10% vertical non-denaturing polyacrylamide gel at 20 mA. The gel was stained by a nucleic acid gel stain (SYBR Gold, Eugene, Oregon, USA).

RNA extraction

Gingival biopsies of twelve control and twelve generalized chronic PD individuals who presented CAL $\geq$ 5 mm were collected and immediately stored in a tube containing RNAholder® (Bioagency, Brazil) at room temperature for 24 h. Then samples were frozen at -20°C for 24 h and after frozen at -70°C until analyses. Total RNA was purified using the TRIZOL reagent (Invitrogen Carlsband, CA) following the manufacturer's recommendations.

Reverse Transcription and Real Time PCR

One microgram of total RNA was treated with DNase (Invitrogen Carlsband, CA) and 500 ng was used for cDNA synthesis. The reaction was carried out using the First strand cDNA synthesis kit (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. After, a fragment of 172 bp was amplified using specific primers (forward 5'gccaaagagaatatccgaac tttaat3'/reverse 5'ctggctagcagactaggg3') by quantitative PCR that was performed in the LightCycler® system (Roche Diagnostics GmbH, Indianapolis, IN, USA) using the Fast-Start DNA Master Plus SYBR Green kit (Roche Diagnostic GmbH).

The reaction product was quantified using the Relative Quantification tool (LIGHTCYCLER® Software 4; Roche Diagnostics GmbH), with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as the reference gene.

Statistical Analysis

The associations between PD, SNP rs4073, gender, age and ethnic group in the control and generalized chronic PD subjects were adjusted by a multivariate logistic regression modeling, which allows, simultaneously, a better control on the experimental variables (R Development Core Team, 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>). Analysis of Hardy-Weinberg equilibrium was used to test deviation of genotype distribution (BioEstat ver.5.0). With respect to gene expression, an intergroup analysis was performed by the Mann-Whitney test at a level of 5%.

Results

The demographic characteristics of the studied population are summarized in Table 1 and the genotype distributions for the SNP rs4073 were in Hardy-Weinberg equilibrium ($P = \square 0.05$). Statistical analysis showed a significant association between genotype and generalized chronic PD ($p=4.78 \times 10^{-3}$); in addition, the multivariate analysis also showed an association between age and generalized chronic PD ($p=4.32 \times 10^{-7}$). The observed genotypes frequencies in the control group were TT = 37.03%, TA = 48.16% and AA = 14.81%, resulting in an A allele frequency of 38.75% and carrier frequency of at least one A allele of 62.97%. On the other hand, the frequencies of TT, TA and AA genotypes found in the generalized chronic PD group were 15.50%, 74.00% and 10.50% respectively, resulting in an A allele frequency of 47.36% and carrier frequency of at least one A allele of 84.5% (Table 2).

Data for gene expression analysis demonstrated that IL-8 mRNA levels were higher in the generalized chronic PD subjects, mainly in those who presented the TA genotype. The difference amongst the two groups was statistically significant ($p = 0.03$; Mann-Whitney Test) (Figure 1).

Discussion

The subjects under investigation were Brazilian individuals with generalized chronic PD whose genotypes were compared to those from controls with adjustments made on age, gender and ethnicity. In the current study, the SNP 4073, that functionally influences IL-8 transcription levels and is associated with several diseases, was tested for association with PD. There are few reports associating IL-8 expression and *IL8* genotypes in the literature, however Hull & Thomson & Kwiatkowski (2000), investigating the association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the SNP rs4073 suggest that blood cells from individuals carrying the A allele produce higher levels of IL-8 in response to stimulus with LPS. One year later, in another study (Hull et al. 2001), the authors described eight novel polymorphisms in the *IL8* gene, in addition to SNP rs4073. They observed that the -251A/781T haplotype showed a significant association with susceptibility to bronchiolitis. A recent study, in a Mexican population, analyzed 78 patients with histologically confirmed distal gastric cancer and 259 non-cancer controls and showed that the A allele is related to the development of distal gastric cancer (Garza-Gonzales et al. 2007). Furthermore, Kamali-Sarvestani & Aliparasti & Atefi (2007) observed an increased frequency in the production of IL-8 in breast cancer patients carrying the AA genotype. With regard to aged-related macular degeneration (AMD), Goverdhan et al. (2008) concluded that the AA genotype is an important risk factor for AMD; and Vairaktaris et al. (2007) reported that the A allele was observed in all DNA samples of 158 German and Greek patients with squamous cell carcinoma, in comparison to 156 healthy controls of equivalent sex, ethnicity and age.

In this cross sectional study, logistic regression modeling demonstrated an association between the SNP rs4073 and generalized chronic PD. The multivariate analysis was also used to assess important factors known to influence the pathogenesis of PD, as gender, age and ethnicity. Results demonstrated association between age and generalized chronic PD ($p=4.32 \times 10^{-7}$). In fact, there is an increase in the increasing age related both prevalence and severity of PD (Flemmig 1999; Borrell & Papapanou 2005). However, the

relationship between age and PD is not straightforward and the literature on the effects of age on PD needs to be interpreted with caution (Borrell & Papapanou 2005).

Results showed a decrease in the frequency of the TT genotype (40% in the control group versus 15% in diseased group) and an increase in the frequency of the TA genotype (48.16% in the control group versus 74% in the diseased group). Since the A allele is considered as the risk allele and up regulates the IL-8 levels after stimulation with LPS (Hull et al. 2000), it is possible to infer that the T allele could be a protection allele against disease. The presence of the heterozygous genotype (TA) in the subjects who presented generalized chronic PD was about 74%. This percentage is higher than reported for African-American (37%) and European populations as well (~40%-46%); interestingly, on the other hand, our findings are in agreement with the percentage of the A allele found in the Europeans (36%). In addition, 84.5% of the individuals who presented chronic PD carried at least one A allele. The multivariate regression analysis modeling also showed an association between the SNP rs4073 and PD ($p=4.78 \times 10^{-3}$). Closing, although there is a substantial variability in the levels of IL-8 mRNA transcripts in the gingival biopsies of the individuals analyzed, we found the greatest levels of transcripts in the generalized chronic PD group, mainly in individuals who presented the TA genotype and therefore the A allele. The statistical difference amongst the TA and TT genotype, in diseased group, was not significant, but it was significant amongst the TA genotypes between the two groups studied ($p=0.03$). Therefore, all the results point to an association of the A allele with the process of the disease, likely by inciting an increase in the production of the transcripts during the inflammation resulting from the periodontitis.

In contrast to the findings of the present report, in a recent study (Kim et al. 2009) of the same SNP, in a Brazilian population as well, the authors did not detect any association with PD. In a literature review, it is possible to notice that genetic associations may not uniformly consistent across populations, the frequency of occurrence of these polymorphisms appears to vary extensively between ethnic groups, the subjects samples involved are generally of limited size, the definitions of the outcome variable (periodontitis) vary considerably, and adjustments for other important covariates and risk factors have frequently not been performed (Borrell & Papapanou 2005). In this particular

case, some of these factors may be involved, associated with the fact that the subjects included in the present study were strictly non-smoker subjects inasmuch as the sample of the Kim et al. (2009) study was composed of smokers and non-smokers subject. Also, the authors did not associate the levels of the IL-8 transcripts with the genotypes TT, TA and AA, as we did in this current paper. The failure to replicate results is a common event in the search for genetic determinants of complex diseases, due either to genuine population heterogeneity or a different sort of bias (Ioannidis et al. 2001). Alternatively, the SNP rs4073 may also be in linkage disequilibrium with functional variants elsewhere in the *IL8* loci, as showed by Hull et al. 2001 or in neighbouring genes (Goverdhan et al. 2008).

The results of the present investigation suggests, for the first time, that the SNP rs4073 is associated with generalized chronic PD in non-smoker Brazilian subjects, since the presence of the A allele, considered as the risk allele, is related to the increase in the production of IL-8 mRNA transcripts, in the presence of the periodontal inflammation. Importantly, this significance was preserved even after correcting for factors such as age, gender and ethnicity. However, future investigations may provide further support for this hypothesis; in addition, *IL8* gene haplotype investigations could increase our knowledge regarding genetic mechanisms involved in PD process.

Acknowledgement: The authors express their gratitude to Prof. Dr. Antonio Augusto Franco Garcia from Department of Genetics, "Luiz de Queiroz" College of Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba, Brazil, for his assistance with the statistical analyses of the data.

References

- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**,1-6.
- Astolfi, C. M., Shinohara, A. L., da Silva, R. A., Santos, M. C., Line, S. R. P. & de Souza, A. P. (2006) Genetic polymorphisms in the MMP-1 and MMP-3 gene may contribute to chronic periodontitis on a Brazilian population. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 699-703.
- Borrell, L. N. & Papapanou, P. N. (2005) Analytical epidemiology of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, S132-158.
- DeForge, L. E., Fantone, J. C., Kenney, J. S. & Remick, D. J. (1992) Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *Journal of Clinical Investigation* **90**, 2123–2129.
- Ferreira, S. B. Jr., Trombone, A. P., Repeke, C. E., Cardoso, C. R., Martins, W. Jr., Santos, C. F., Trevilatto, P. C., Avila-Campos, M. J., Campanelli, A. P., Silva, J. S. & Garlet, G. P. (2008) An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. *Infection and Immunity* **76**, 3725-3734.
- Flemmig, T. F. (1999) Periodontitis. *Annals of Periodontology* **4**, 32-37.
- Garza-Gonzalez, E., Bosques-Padilla, F. J., Mendoza-Ibarra, S. I., Flores-Gutierrez, J. P., Maldonado-Garza, H. J. & Perez-Perez, G. I. (2007) Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer* **7**, 70.
- Goverdhan, V., Ennis, S., Hannan, S. R., Madhusudhana, K. C., Cree, A. J., Luff, A. J. & Lotery, A. J. (2008) Interleukin-8 promoter polymorphism -251A/T is a risk factor for age-related macular degeneration. *British Journal of Ophthalmology* **92**, 537-540.

- Hart, T. C. & Kornman, K. S. (1997) Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000* **14**, 202-215.
- Hull, J., Ackerman, H., Isles, K., Usen, S., Pinder, M., Thomson, A. & Kwiatkowski, D. (2001) Unusual haplotypic structure of *IL8*, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *American Journal of Human Genetics* **69**, 413–419.
- Hull, J., Thomson, A. & Kwiatkowski, D. (2000) Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* **55**, 1023-1027.
- Ioannidis, J.P., Ntzani, E. E., Trikalinos, T.A. & Contopoulos-Ioannidis, D. G. (2001) Replication validity of genetic association studies. *Nature Genetics* **29**, 306-309.
- Kamali-Sarvestani, E., Aliparasti, M. R. & Atefi, S. (2007) Association of interleukin-8 (IL-8 or CXCL8) -251T/A and CXCR2 +1208C/T gene polymorphisms with breast cancer. *Neoplasma* **54**, 484-489.
- Kim, Y. J., Viana, A. C., Curtis, K. M., Orrico, S. R., Cirelli, J. A. & Scarel-Caminaga, R. M. (2009) Lack of association of a functional polymorphism in the interleukin 8 gene with susceptibility to periodontitis. *DNA and Cell Biology* **28**, 185-90.
- Louropoulou, A., van der Velden, U., Schoenmaker, T., Catsburg, A., Savelkoul, P. H. & Loos, B. G. (2008) Mannose-binding lectin gene polymorphisms in relation to periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 923-930.
- Marshall, J. C. (2005) Neutrophils in the pathogenesis of sepsis. *Critical Care Medicine* **33**, S502-504.
- McCarron, S. L., Edwards, S., Evans, P. R., Gibbs, R., Dearnaley, D. P., Dowe, A., Southgate, C., Easton, D. F., Eeles, R. A. & Howell, W. M. (2002) Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Research* **62**, 3369-3372.
- Michalowicz, B. S. (1994) Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *Journal of Periodontology* **65**, 479-488.

- Michalowicz, B. S., Aepli, D., Virag, J. G., Klump, D. G., Hinrichs, J. E., Segal, N. L., Bouchard, T. J. Jr. & Pihlstrom, B. L. (1991) Periodontal findings in adult twins. *Journal of Periodontology* **62**, 293-299.
- Nibali, L., D'Aiuto, F., Donos, N., Griffiths, G.S., Parkar, M., Tonetti, M.S., Humphries, S. E. & Brett, P. M. (2009) Association between periodontitis and common variants in the promoter of the interleukin-6 gene. *Cytokine* **45**, 50-4.
- Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J. & Kornman, K. (1997) Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000* **14**, 216-248.
- Park, O. J., Shin, S. Y., Choi, Y., Kim, M. H., Chung, C. P., Ku, Y. & Kim, K. K. (2008) The association of osteoprotegerin gene polymorphisms with periodontitis. *Oral Diseases* **14**, 440-4.
- Remick, D. G. (2005) Interlukin-8. *Critical Care Medicine* **33**, S466-467.
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F. & Cassatella, M. A. (2000) The neutrophils as a cellular source of chemokines. *Immunological Reviews* **177**, 195-203.
- Schenkein, H. A. (2002) Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the climb worth the view? *Periodontology 2000* **30**, 79-90.
- Trevilatto, P. C. & Line, S. R. P. (2000) Use o buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *Journal of Forensic Odonto-Stomatology* **18**, 6-9.
- Vairaktaris, E., Yapijakis, C., Serefoglou, Z., Derka, S., Vassiliou, S., Nkenke, E., Vyllyotis, A., Wiltfang, J., Avgoustidis, D., Critselis, E., Neukam, F. W. & Patsouris, E. (2007) The interleukin-8 (-251A/T) polymorphism is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology* **33**, 504 -507.
- Yucel-Lindberg, T. & Brunius, G. (2006) Epidermal growth factor synergistically enhances interleukin-8 production in human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 β . *Archives of Oral Biology* **51**, 891-898.

Table 1 - Demographic parameters of studied population

	<i>Control</i>	<i>Generalized chronic PD</i>	<i>p value</i>
	n=108	n=181	
<i>Age (years)</i>			
Mean ($\pm$ SD)	37.23 $\pm$ 12.82	44.06 $\pm$ 8.77	<0.01*
<i>Gender (%)</i>			
Female	66.33	67.15	0.97**
Male	33.67	32.85	
<i>Ethnic group (%)</i>			
Caucasoid	75.00	77.36	0.15**
Afro-merican	12.96	06.62	
Mulatto	10.18	16.02	
Japanese	01.86	00.00	

Table 2. Genotypes distribution of *IL8* SNP (4073), adjusted by multivariate logistic regression modeling and distribution of the allele frequency of the *IL8* SNP (4073), analysed by χ^2 square.

<i>SNP</i>	<i>Control</i>	<i>Generalized Chronic</i>	<i>p value</i>
<i>(rs4073)</i>	<i>(N=108)</i>	<i>PD (N=181)</i>	
<i>Genotype</i>			
<i>AA</i>	17 (14.81%)	19 (10.5%)	reference
<i>TA</i>	51 (48.16%)	134 (74.0%)	0.00478*
<i>TT</i>	41 (37.3%)	28 (15.5%)	0.84
<i>Alleles</i>			
<i>A</i>	38.75%	47.36%	0.27
<i>T</i>	61.25%	52.64%	

SNP indicates single nucleotide polymorphism; PD indicates periodontal disease; N indicates number of informative individuals. *Statistically significant difference was observed comparing control versus generalized chronic PD.

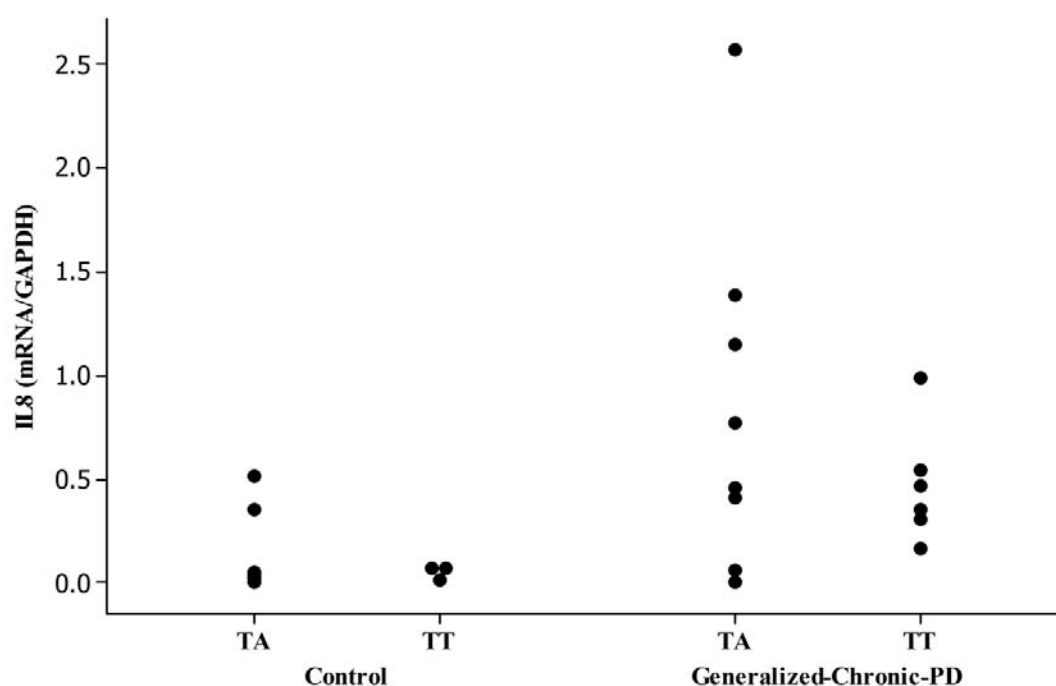


Figure 1 - Quantitative expression of *IL8* gene in gingival tissues of patients from the two groups according to genotypes TT and TA. None of the 24 gingival biopsies presented the AA genotype. Total RNA was extracted, and levels of IL-8 were measured quantitatively by real-time PCR SYBR-Green System. The results are presented as the fold increase of expression of the mRNA, with normalization to GAPDH, when compared with the target-internal control of control subjects using the cycle threshold (Ct) method.

Capítulo 2: GENETIC ANALYSIS OF THE *IL8* -251T/A POLYMORPHISM IN FAMILIES WITH AGGRESSIVE PERIODONTITIS

Denise Carleto Andia¹, Ariadne Letra², Renato Corrêa Viana Casarin³, Marcio Zaffalon Casati³, Sergio Roberto Peres Line¹, Ana Paula de Souza¹.

¹Department of Morphology, Division of Histology, Laboratory of Molecular Biology; School of Dentistry at Piracicaba, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

²Department of Oral Biology and Center for Craniofacial and Dental Genetics, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, USA.

³ Department of Prosthodontics and Periodontics, Division of Periodontics, School of Dentistry at Piracicaba, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Dra. Ana Paula de Souza

Department of Morphology, School of Dentistry at Piracicaba, University of Campinas.

Avenue Limeira 901,

CEP 13414-018 Piracicaba-SP, Brazil

Phone: +55 19 21065214

anapaulapardo@fop.unicamp.br

Running title: Aggressive periodontitis in Brazilian families.

Key words: aggressive periodontitis, *IL8*, family, allele.

Abstract

Background and Objectives: Familial aggregation of aggressive periodontitis (AgP) cases indicates that genetic factors may be important in disease susceptibility. Interleukin-8 (IL-8) is important in the regulation of the inflammatory response, which is the hallmark of periodontitis; moreover, analyses of a functional polymorphism (rs4370) in the *IL8* gene have shown that the A allele up regulates IL-8 levels after stimulation with lipopolysaccharide. The intent of this study was to investigate the transmission pattern of the A allele within families affected with generalized AgP and the association with the susceptibility to AgP in Brazilian families.

Material and Methods: The single-nucleotide polymorphism (SNP) (rs4370) was detected and analyzed by standard polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay in 39 subjects from 13 nuclear families. The statistical analysis was performed using the transmission disequilibrium test (TDT) in the Family-Based Association Test (FBAT) package.

Results: There was no statistically significant association of the *IL8* SNP rs4370 with AgP, with a balanced transmission of the alleles (allele T: $Z=1.213$, $p=0.2252$; allele A: $Z=-1.213$, $p=0.2252$). In addition, there is also similar allele frequency (allele T: 52% and allele A: 48%). On the other hand, 80% of the diseased subjects presented at least one A allele.

Conclusions: The A allele, considered the less common and the risk allele was transmitted in a similar frequency as the T allele. However, it was present in the genotypes of 80% of the diseased subjects, which leads us to infer that the A allele may have an active participation in the AgP process.

Introduction

Aggressive periodontitis (AgP) is a type of periodontitis that can promote a rapid attachment loss and bone destruction that usually affects healthy juveniles or early adults (1) and is characterized by familial aggregation (2). Systemic diseases, microbiologic and environmental factors (e.g., smoking, oral hygiene, stress, and life style) have been suggested to influence the risk of developing AgP (3). However, such familial aggregation of cases indicates that genetic factors may be important in susceptibility (2). Hence, family history is now considered a primary diagnostic criterion for current classification of AgP (1,4) and family screening could be used as a preventive diagnostic tool (4).

The interleukin-8 gene (*IL8*), located on chromosome 4q12-q13, comprises 4 exons and encodes a small protein, with the mature, fully processed form having only 72 amino acids called IL8 (5). IL-8, the most potent known chemokine, is responsible for inducing chemotaxis, which is the directed migration of cells to a site of inflammation (5). This chemokine is important in the regulation of the inflammatory response for its ability to recruit and activate acute inflammatory cells. It is also able to mediate the activation and migration of neutrophils, which is the first line of defense against periodontopathic bacteria, into tissue from blood (6,7). Moreover, IL-8 is also relatively unique since it may be produced early in the inflammatory response, but will persist for a prolonged period of time, for days or even weeks (5,8).

The genetic factors for AgP have been extensively studied in the last decades, including studies aimed to identify candidate genes in association with AgP (4,9-14). The *IL8* gene single-nucleotide polymorphism (SNP) at position -251T/A (rs4073 - reference sequence number from the NCBI's Entrez system) has been extensively described in the literature and associated with several diseases (15-20). However, to date, the association of this polymorphism with AgP has not been studied. Analyses have shown that the A allele up regulates IL-8 levels after stimulation with lipopolysaccharide (16); therefore, it could be interesting to investigate the association of the functional -251T/A polymorphism with AgP. The intent of this study was to investigate the association of this polymorphism with

the AgP process in affected Brazilian families. We also report the transmission pattern of the A allele in the families.

Material and Methods

Study population

Subjects from the Southeastern region of Brazil were recruited from the patient pool of the Dental Clinics of the School of Dentistry at Piracicaba, State University of Campinas. This study was approved by the Ethical Committee for Research of the State University of Campinas (Protocol number 095/2007), and informed consent was signed by each subject after explanations were provided. All patients with possible contributory medical history, such as specific recognized genetic disease with periodontal manifestations (i.e. Papillon-Lefevre syndrome), smoking, diseases of the oral hard or soft tissues (except caries and periodontal disease), need for pre-medication for dental treatment, chronic usage of corticosteroids, diabetes, hepatitis or HIV infection, immunosuppressive medications, history of any disease known to severely compromise immune function, presence of necrotizing ulcerative gingivitis, or current pregnancy or lactation were excluded.

Diagnosis and classification of generalized AgP were performed based on the 1999 Consensus Classification of Periodontal Diseases (1). The diagnostic classification considered the clinical parameters and consisted of physical examination, full medical and dental history, probing pocket depth (PPD), assessment of clinical attachment loss (CAL), tooth mobility and observation of gingival bleeding on probing and radiographic evaluation. Measurements of probing depth and attachment level were recorded at six points around each tooth. The clinical parameters were obtained by one calibrated examiner (intraclass correlation = 0.94).

Initially, a total of 72 generalized AgP patients and their relatives were recruited. However, several families were excluded during the course of the study, due to several reasons including lack of further interest in the study, no contact with relatives, family living in another state, adopted probands, and the fact that some patients simply did not wish to have a dental examination performed. The study was then accomplished with

thirty nine individuals, thirteen non-smoking subjects affected by generalized AgP (probands) and their parents, as described below:

1. *AgP probands (n=13)*: Subjects presented periodontal pockets with a clinical attachment loss and radiographic bone loss in at least 3 teeth that were not 1st molars and incisors; age inferior than 35 years; at least eight teeth with a probing pocket depth (PPD) of > 5mm and bleeding following pocket probing. At least two of the eight qualifying teeth should have PPD > 7 mm.
2. *AgP parents (n=8)*: The progenitors presented the same characteristics as well, but had experienced multiple tooth loss due to the progress of the disease; in addition, they presented an age superior than 35 years.
3. *Non-AgP parents (n=18)*: The progenitors found to exhibit no signs of AgP.

With respect to the progenitors, the diagnosis of AgP was obtained after careful intra-oral examination and evaluation of a full medical and dental history questionnaire, with particular regard to periodontal treatment. When patients had experienced multiple tooth loss, an effort was made to understand the cause of the tooth loss and to obtain past radiographic and dental data. In some cases, a contact was made with their respective private dentists.

Genetic analysis

Isolation of genomic DNA

The sampling of buccal epithelial cells was performed as described by Trevilatto & Line (2000) (21). DNA was then purified by sequential phenol/chloroform extraction and salt/ethanol precipitation. DNA was dissolved in 70 ml TE buffer [10mM Tris (pH 7.8), 1mM EDTA] and its concentration estimated by measuring absorbance at 260 nm using a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Evolution 60, Madison WI, USA). DNA integrity was checked and quantitated using agarose gel electrophoresis.

PCR

A fragment of 349 bp of the *IL8* gene promoter (GenBank M28130) was PCR-amplified with specific primers: (forward) 5'-CATGATAGCATCTGTAATTAAGT

3' and (reverse) 5'- CTCATCTTTTCATTATGTCAGAG- 3'. PCR was carried out in a total volume of 10 µl, containing 1 µl genomic DNA, 1.5 µl of each primer and 5 µl of Go Taq Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA). The solution was incubated for 5 min. at 95°C, followed by 35 cycles of 1 min. at 95°C, 1 min. at 51°C and 1 min. at 72°C, with a final extension of 72°C for 7 min.

Genotyping SNP rs4073

The restriction endonuclease digestion was prepared using a 5 µl aliquot of *IL8* PCR products mixed with a 5 µl solution containing 1 µl 10 X NE Buffer (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, pH 7.9), 0.25 µl *MfeI* (10,000 U/ml) (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) and 3.75 µl sterile deionized H₂O. The solution was incubated at 37°C overnight. The A allele completes a corresponding restriction endonuclease site, while the G allele does not. The length difference of the RFLP fragments was 147pb and 55pb (TT 349bp; TA 349bp, 202bp and 147bp; AA 202bp and 147bp). Aliquots of 5 µl of the RFLP products were electrophoresed on 10% vertical non-denaturing polyacrylamide gel at 20 mA. The gel was silver stained by a nucleic acid gel stain (SYBER Gold, Eugene, Oregon, USA).

Statistical analysis

The association of the A allele with AgP patients in the families was analyzed by the transmission disequilibrium test TDT (22), using the Family-Based Association Test package (FBAT, version 2.0.3). The program constructs, by default, a test of the null hypothesis: no linkage and no association (23). The TDT test analyzes whether the transmission of an allele from parents who are heterozygous at the marker tested to the probands deviates significantly from the expected value of 50%.

Results

A total of 13 families (39 individuals) participated in this study and the demographic characteristics are summarized in Table 1. The results showed that all 13

families were informative for TDT analysis, having at least one parent who was heterozygous for SNP rs4073. Hardy-Weinberg equilibrium was satisfied for SNP ($p=0.2357$). Table 2 shows that there was a balanced transmission between the alleles (allele T $Z=1.213$, $p=0.2252$; allele A $Z=-1.213$, $p=0.2252$). In addition, there was balanced distribution of allele frequencies as well (allele T= 52% and allele A= 48%). In the diseased subjects (AgP probands plus AgP parents), the heterozygous genotype (TA) was the most frequent (66.7%), followed by the TT genotype (19%) and by the AA genotype (14.3%). We also found that 80% of the diseased subjects presented at least one A allele.

Discussion

AgP is characterized by familial aggregation (2) which suggests the possible involvement of genetic factors. The *IL8* gene product is responsible for the directed migration of cells to a site of inflammation (5) and is important in the regulation of the inflammatory response which is the hallmark of periodontal disease. Moreover, the *IL8* gene has a functional SNP (rs4073) in which the A allele has been demonstrated to up regulate IL-8 levels after stimulation with lipopolysaccharide (16).

The present family-based study benefited from the use of 13 nuclear families, consisting of probands with AgP and their first-degree blood relatives. The advantage of a family study design, compared with a case-control design, is the elimination of control subjects whose genetic background differs systematically from those of cases (24); on the other hand, a limitation of family based analysis is that it does not provide a direct measure of relative risk for disease within the population as a whole. It has been proposed that this may be overcome by using the alleles that are *not* transmitted from heterozygous parents to affected offspring to estimate allele frequencies within the general population (16). The transmission disequilibrium test used in this study is based on the distribution of the offspring genotypes conditional on any trait information and on the parental genotypes, not on the parental trait information. Therefore, problems of diagnosis of AgP in the elderly can be better managed. In general, genetic studies of AgP have been hampered by many factors, including a variable onset of the trait, lack of phenotypic information for edentulous family

members, or diagnostic difficulties in elderly individuals (3,25,14). In addition, the condition that all study subjects be non-smoking also hampers the ability of having large sample sizes.

The prevalence of generalized AgP in the first-degree blood relatives was 30.8%, which is higher than has been reported in a previous study (10%) (4). The prevalence of AgP has been reported to vary greatly in different populations and generally, low prevalence rates (~0.1% to 0.5%) have been reported among Caucasians in developed countries (26). The prevalence of AgP in South America is about 1% and varies among other ethnic groups such as African and African-Americans, ranging from 0.5% to 3% (26). The difference between both studies may be attributed to some degree of admixture in the Brazilian population, with a high incidence of Africans, African-Americans and South-Americans. Nevertheless, the significant prevalence of AgP in first-degree blood relatives observed in this study corroborates with the findings of Nibali et al. (4). These authors state the concept of familial aggregation in AgP and suggest the employment of routine examination of first-degree blood relatives of AgP patients as a tool for secondary prevention.

The SNP (rs4073), in the promoter region of the *IL8* gene, is the only one known to influence its expression (16). The current study showed a balanced transmission between the alleles within families; however, the presence of the heterozygous genotype (TA) in the subjects with generalized AgP was about 67%. This percentage is higher than reported for African-American (37%) and European populations as well (~40%-46%). In addition, the TA genotype plus the AA genotype match to 80% of all the genotypes in diseased subjects. Although we did not find significant differences in the pattern of transmission of the A allele within families, 80% of the individuals who presented AgP and 48% of the total individuals carried at least one A allele, which is considered the risk allele.

To our knowledge, this is the first investigation on generalized familial AgP and association with the *IL8* gene polymorphism. Our results highlight the importance of an usual examination in the offspring of patients with AgP, targeting the establishment of a preventive routine to reduce possible damages associated with the disease, such as

pronounced tooth loss. Future investigations should comprise increased sample sizes to confirm the present results.

Given our incomplete knowledge of the pathogenesis of periodontal diseases, the search for specific genetic and microbiologic profiles that may be associated with AgP has been crucial. It is possible that various and different genes, individually and interactively, may contribute to the onset and progression of the disease. In addition, these genes may further interact with environmental factors to determine the extension of the disease. The identification of candidate polymorphisms for AgP will shed light on the genetic mechanisms associated with the disease and will be critical for the development of new approaches to prevent or slow down AgP development. Although half of the total individuals carried at least one A allele, the transmission pattern and its genotype combination are balanced, in generalized aggressive individuals and in the control subjects.

Acknowledgements

This research was supported by CAPES and FAPESP (07/02488-0).

References

1. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;**4**:1-6.
2. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;**4**:39-52.
3. Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol* 2000 2005;**39**:91-117.
4. Nibali L, Donos N, Brett PM, et al. A familial analysis of aggressive periodontitis – clinical and genetic findings. *J Periodont Res* 2008;**43**:627-634.
5. Remick DG. Interleukin-8. *Crit Care Med* 2005;**33**,S466-467.
6. Marshall JC. Neutrophils in the pathogenesis of sepsis. *Critical Care Medicine* 2005;**33**,S502-504.

7. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophils as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 2000;**177**:195-203.
8. DeForge LE, Fantone JC, Kenney JS, Remick DJ. Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *J Clin Invest* 1992;**90**:2123–2129.
9. Michel J, Gonzáles JR, Wunderlich D, Diete A, Herrmann JM, Meyle J. Interleukin-4 polymorphisms in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;**28**:483-488.
10. Shapira L, Stabholz A, Rieckmann P, Kruse N. Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promoter region in families with localized early-onset periodontitis. *J Periodont Res* 2001;**36**:183-186.
11. Fu Y, Korostoff JM, Fine DH, Wilson ME. Fc gamma receptor genes as risk markers for localized aggressive periodontitis in African-Americans. *J Periodontol* 2002;**73**:517-523.
12. Li QY, Zhao HS, Meng HX, et al. Association analysis between interleukin-1 family polymorphisms and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population. *J Periodontol* 2004;**75**:1627-1635.
13. Quappe L, Jara L, López NJ. Association of interleukin-1 polymorphisms with aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2004;**75**:1509-1515.
14. Ren XY, Xu L, Meng HX, et al. Family-based association analysis of S100A8 genetic polymorphisms with aggressive periodontitis. *J Periodont Res* 2009;**44**:184–192.
15. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez GI. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer* 2007;**7**:70.
16. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 2000;**55**:1023-1027.

17. Kamali-Sarvestani E, Aliparasti MR, Atefi S. Association of interleukin-8 (IL-8 or CXCL8) -251T/A and CXCR2 +1208C/T gene polymorphisms with breast cancer. *Neoplasma* 2007;**54**:484-489.
18. Goverdhan SV, Ennis S, Hannan SR, et al. Interleukin-8 promoter polymorphism - 251A/T is a risk factor for age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2008;**92**:537-540.
19. Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, et al. The interleukin-8 (-251A/T) polymorphism is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2007;**33**:504-507.
20. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 2002;**62**:3369-3372.
21. Trevilatto PC, Line SRP. Use o buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol* 2000;**18**:6-9.
22. Spielman RS, McGinnis RE, Ewenst WJ. Transmission Test for Linkage Disequilibrium: The Insulin Gene Region and Insulin-dependent Diabetes Mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993;**52**:506-516.
23. Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype-phenotype associations. *Eur J Hum Genet* 2001;**9**:301-306.
24. Goldstein AM, Andrieu N. Detection of interaction involving identified genes: available study designs. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1999;**26**:49-54.
25. Boughman JA, Beaty TH, Yang P, Goodman SB, Wooten RK, Suzuki JB. Problems of genetic model testing in early onset periodontitis. *J Periodontol* 1988;**59**:332-337.
26. Albandar JM, Tinoco EMB. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontology 2000* 2002;**29**:153-176.

Table 1 - Demographic characteristics of the studied population

	<i>Healthy</i> (<i>n=18</i>)	<i>Aggressive periodontitis</i> (<i>n=21</i>)
Age (years)		
Mean ($\pm$ SD)	52.11 $\pm$ 7.05	38.14 $\pm$ 14.99
Gender		
Female	9	16
Male	9	15
Ethnic group (%)		
Caucasoid	55.55	57.15
Mestizo	38.88	23.80
Afro-American	5.56	19.05

Table 2 - Results of genetic analyses of *IL8* SNP (rs4073) in families with aggressive periodontitis.

Allele	N	Freq	Fam	S	E (s)	Var (s)	Z	p value
T	40	0.52	13	15	12.500	4.250	1.213	0.2252
A	38	0.47	13	9	11.500	4.250	-1.213	0.2252

Fam indicates number of informative families in which there is at least one heterozygous parent; $Z = [S - E(s)] / \text{SQRT}[\text{Var}(s)]$; $S = \sum_{ij} T_{ij} X_{ij} \cdot X_{ij}$ denotes the genotype of the j -th offspring in family i at the locus being tested; the T_{ij} is the coded trait; $E(s)$ is the expected value and $\text{Var}(s)$ means the variance.

Capítulo 3: DNA methylation status of the *IL8* gene promoter in aggressive periodontitis.

Denise Carleto Andia¹, Naila Francis Paulo de Oliveira¹, Renato Corrêa Viana Casarin², Marcio Zaffalon Casati², Sergio Roberto Peres Line¹, Ana Paula de Souza¹.

¹Department of Morphology, Division of Histology, Laboratory of Molecular Biology; School of Dentistry at Piracicaba, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil

²Department of Prosthodontics and Periodontics, Division of Periodontics, School of Dentistry at Piracicaba, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil

Corresponding author:

Dra. Ana Paula de Souza

Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP

Departamento de Morfologia

Avenida Limeira 901,

CEP 13414-018 Piracicaba-SP, Brazil

Phone: +55 19 21065214

anapaulapardo@fop.unicamp.br

Running title: Methylation of *IL8* gene in periodontitis.

Key words: epigenetic, methylation, aggressive periodontitis, *IL8*.

Conflict of interest and source of funding statement

There are no conflicts of interest associated with this work.

This study was supported by FAPESP (2007/02488-0). Andia was supported by the Capes, Brazil

Abstract

Aim: Studies evaluating the methylation status of cytokines genes may have relevance for inflammatory diseases in which the expression of some cytokines is altered, such as periodontitis. The aim of the present study was to observe the DNA methylation status in the *interleukin (IL8)* gene promoter in cells of the oral epithelium of control subjects and to compare it with those of subjects affected with generalized aggressive periodontitis (AgP).

Materials and Methods: Genomic DNA from epithelial oral cells of 37 generalized AgP patients and 37 controls were purified and modified by sodium bisulphite. Modified DNA was submitted by methylation-specific polymerase chain reaction (PCR-MSP), electrophoresed on 10% polyacrylamide gels and stained with SYBR Gold.

Results: Subjects who presented generalized AgP have a higher frequency of hypomethylation of the *IL8* gene promoter than those controls (86.5% in the generalized AgP group versus 62% in the control group; $p=0.016$; χ^2 test).

Conclusion: It was found a marked hypomethylated status of epithelial oral cells in the subjects who presented generalized AgP, comparing to the controls, in the promoter region of the *IL8* gene. Possibly, the methylation mechanism presented in this region might be another gear that participates in the disease process and therefore it may be important in the aetiology and pathogenesis of generalized AgP.

Introduction

Over the past few years, efforts have been made to understand how the genetic information is organized and, mostly, how the expression of genes is regulated. DNA methylation has been a growing focus of epigenetic studies and the association with mammalian development and many human diseases is becoming clearer. Enzymes known as DNA methyltransferases (DNMTs) have the ability to add methyl groups to the C5 position of DNA cytosines in CpG dinucleotides sites along the genome or at CpG sites (Egger et al. 2004, Johnson & Belshaw 2008). When the methylation occurs in the regulatory regions, it likely silences the gene by interfering with the access of transcription factors to the promoter region (Deng et al. 2001). Under normal physiologic conditions, methylation of CpG sites is maintained by DNA methyltransferases as a regulatory mechanism for the transcriptional repression of certain genes and silencing of transposable elements and protective mechanism for defense against viral sequences as well; on the other hand, pathological methylation can result in the silencing of tumour-suppressor or other cancer-relevant genes (Egger et al. 2004).

Recent studies have demonstrated an association between variations in the DNA methylation profile and certain disease states, including some kinds of cancer (Chang et al. 2006, Blanco et al. 2007, Ahlquist et al. 2008, Liu et al. 2009, Malekzadeh et al. 2009) and inflammatory diseases (Stenvinkel et al. 2007, Furuta et al. 2008). Strong association exists between states of chronic inflammation and cancer, and it is believed that mediators of inflammation may be responsible for this phenomenon (Hodge et al. 2005).

Aggressive periodontitis (AgP), an infectious disease characterized by a destructive inflammatory process, is a specific type of periodontitis that usually affects healthy juveniles and young adults (Armitage 1999). It is characterized by rapid attachment loss and bone destruction and familial aggregation (Tonetti & Mombelli 1999). Periodontal destruction occurs as a host response to bacterial challenge and depends on the nature and virulence of the pathogen; moreover, it might be influenced by environmental and genetic factors (Borrell & Papapanou 2005). The degradation of periodontal tissues is narrowly related to a range of biological events that include the complex network of pro- and anti-

inflammatory cytokines, growth factors and enzymes. Interleukin-8 (IL-8), the most potent known chemokine, is constitutively produced. It is responsible for inducing chemotaxis, which is the directed migration of cells to a site of inflammation (Remick 2005). The production of IL-8 can be induced by multiple stimuli including lipopolysaccharide (LPS), live bacteria and early proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF) and Interleukin-1 (IL-1) (Remick 2005). It is secreted by a wide range of cells such as macrophages, monocytes, fibroblasts and epithelial cells. This chemokine is important in the regulation of the inflammatory response for its ability to recruit and activate acute inflammatory cells. It is also able to mediate the activation and migration of neutrophils, which is the first line of defense against periodontopathic bacteria, into tissue from peripheral blood (Scapini et al. 2000, Marshall 2005).

Although genetic composition influences the biologic response by setting an inflammatory capacity for an individual, there is increasing evidence that epigenetics is critical for regulating the inflammatory response in a dynamic way (Bobetsis 2007). Furthermore, it is well known that there is an overexpression of inflammatory cytokines in individuals with periodontitis (Kinane & Hart 2003, Shapira et al. 2005, Moreira et al. 2007). Therefore, studies evaluating the methylation pattern of cytokines genes may have relevance for inflammatory diseases in which the expression of some cytokines is altered, such as periodontitis. These observations raise the question of what would be the correlation between the DNA methylation status of *IL8* gene promoter and subjects who presented AgP. Thus, the aim of the present study was to observe the DNA methylation profile in the *IL8* gene promoter in oral epithelium cells of individuals affected by generalized AgP.

Materials and methods

Study population

Subjects from the Southeastern region of Brazil were recruited from the patient pool of the Dental Clinics of the School of Dentistry at Piracicaba, State University of Campinas. This study was approved by the Ethical Committee for Research of the State University of Campinas, and informed consent was signed by each subject after explanations were provided (272/2006). Seventy four (74) non-smoking subjects were included in this case versus control study (37 AgP patients plus 37 control subjects). All patients with possible contributory medical history, such as specific recognized genetic disease with periodontal manifestations (i.e. Papillon-Lefevre syndrome), smoking, diseases of the oral hard or soft tissues (except caries and periodontal disease), need for pre-medication for dental treatment, chronic usage of corticosteroids, diabetes, hepatitis or HIV infection, immunosuppressive medications, history of any disease known to severely compromise immune function, presence of necrotizing ulcerative gingivitis, or current pregnancy or lactation were not included. Subjects were included in clinical categories following the criteria defined by the American Academy of Periodontology (Armitage 1999). The diagnostic examination considered the clinical parameters and consisted of physical examination, full medical and dental history, probing pocket depth (PPD), assessment of clinical attachment loss (CAL), tooth mobility, observation of gingival bleeding on probing and radiographic evaluation. Measurements of probing depth and attachment level were recorded at six points around each tooth. The clinical parameters were obtained by one calibrated examiner (intraclass correlation = 0.94).

1. *Control group (n=37)*: Subjects found to exhibit no signs of periodontitis as determined by the absence of CAL and no sites with $PPD \geq 3$ mm.
2. *Generalized AgP group (n=37)*: Patients presented periodontal pockets with a clinical attachment loss and radiographic bone loss in at least 3 teeth that were not 1st molars and incisors, age inferior than 35 years and at least eight teeth with a

PPD > 5mm and bleeding following pocket probing. At least two of the eight qualifying teeth should have PPD > 7 mm.

Genetic analysis

Isolation of genomic DNA and bisulphite modification

The sampling of buccal epithelial cells was performed as described by Trevilatto & Line (2000) (21). DNA was then purified by sequential phenol/chloroform extraction and salt/ethanol precipitation. DNA was dissolved in 70 ml TE buffer [10mM Tris (pH 7.8), 1mM EDTA] and its concentration estimated by measuring absorbance at 260 nm using a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Evolution 60, Madison WI, USA). DNA integrity was evaluated using agarose gel electrophoresis. After DNA extraction, 1 μ g purified DNA was modified by sodium bisulphite, whose principle exploits the different sensitivities of cytosine and 5- methylcytosine (5-MeC) to deamination by bisulphite under acidic conditions, in which cytosine undergoes conversion to uracil while 5-MeC remains unreactive (Herman et al. 1996). DNA already modified by sodium bisulphite was purified using Wizard SV Gel and Polymerase chain reaction (PCR) Clean-Up System kit (Promega Corporations, Madison, WI, USA) and stored to -70°C. One sample was methylated *in vitro* using 3U of the recombinant *SssI* CpG methylase (New England Biolabs, Mississauga, ON, USA) in the presence of 160 μ M S-adenosylmethionine at 37°C overnight to serve as a control of the methylated reaction.

Methylation-specific PCR (MSP)

The differences in DNA sequences after treatment with sodium bisulphite were detected by MSP. A fragment of 173bp was amplified with specific primers for either methylated (forward 5'aaaatttcgttatatttcg3'and reverse 5'tccgataactttttatatcat3') or unmethylated (forward 5'aaaattttgttatattttg3'and reverse 5'tccaataactttttatatcat3') targets (GenBank accession number M28130). Each MSP reaction incorporated 100ng of

bisulphite-modified DNA, 1 μ M of each primer and 1 X Go Taq Green Master Mix (Promega Corporations, Madison, WI, USA) in a final reaction of 25 μ L. The methylated and unmethylated cycle conditions were as follows: 95°C x 5 min.; 30 cycles (95°C x 45 s, 47°C x 45 s, 72°C x 45 s); and 72°C x 7 min. Amplified PCR samples were carried on 10% polyacrylamide gels and subjected to electrophoresis. DNA bands were detected after SYBR Gold stain (Invitrogen Carlsband, CA, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by the Statistical SPSS package, version 15.0, investigating the difference in the methylation status in the groups, by the χ^2 test at a level of 5%.

Results

The demographic characteristics of the study population are summarized in Table 1. Figure 1 illustrates the results of DNA purified from epithelial oral cells in both groups. Figure 2 shows that the methylated status between control group and generalized AgP group was statistically significant ($p=0.016$; χ^2 test). The frequency of the individuals in the control group who presented only the unmethylated status was about 62%, while there was an increase in this frequency in the generalized AgP group to 86.5%.

Discussion

The scientific community is just starting to research the epigenetic alterations of the host that potentially modulate the periodontal phenotype. There are several aspects that contribute to the periodontal disease phenotype, such as smoking habit, diabetes, biofilm, predisposing factors such as polymorphisms in candidate genes and possibly DNA methylation. Therefore, even when a genotype is the same at a specific locus comparing two individuals, one may differ from the other due to epigenetic modifications induced by differences in exposures (Feinberg 2007). Epigenetic regulation is a reversible modification in gene expression that is determined by environmental exposures and may be heritable

(Egger et al. 2004, Edwards & Myers 2007), thereby providing a means for propagating information from parental cells to their progeny (Fitzpatrick & Wilson 2003). However, more dynamic changes in epigenetic modulation may occur throughout the life of an individual, conferring phenotypic plasticity in response to such factors as diet, aging, and toxins (Edwards & Myers 2007, Offenbacher et al. 2008, Wilson 2008). Regarding this background, in the present investigation, age and smoking habit, which are known factors that may alter the tissue behavior and modulate periodontitis, were controlled and matched for both study groups.

The promoter region of *IL8* gene is not a typical “CpG island” promoter, since the CpG dinucleotides are sparse in this region. However, in spite of the four CpG sequences located within the vicinity of the reported promoter lack the numbers to constitute a typical “CpG island”, they present potential targets for methylation and the epigenetic suppression of IL-8 promoter activity (de Larco et al. 2003). The CpG dinucleotides selected are located near to nucleotides -136 and +43 of the *IL8* gene promoter. This region contains basal modulator transcription sequences, consisting of four *cis*-regulator elements, an NF- κ B (-82 to -70), a CCAAT/enhancer-binding protein (-94 to -84) and AP-1protein (-126 to -120)-binding sites. The fourth *cis*-regulator element is located between nucleotides -90 and -83, being activated by the Oct-1 factor, which down-regulates the *IL8* transcription (de Larco et al. 2003). These sites are located near TATA and CCAAT boxes, which are important for the initiation of transcription.

DNA methylation is an active process catalyzed by DNMT. These enzymes have the ability to add methyl groups to the C5 position of DNA cytosines in CpG dinucleotides (Egger et al. 2004, Johnson et al. 2008). During the entire experiment, it was observed only two types of methylation status, i.e. the unmethylated band alone or the methylated/unmethylated band together. None of the patients, in both groups, presented the methylated band alone. Most individuals in the control group showed an *IL8* methylation status positive for both conditions; however a high frequency of generalized AgP subjects showed completely unmethylated epithelial oral cells. A recent investigation of our group also showed a higher frequency of hypomethylation status in the same region of the *IL8* gene promoter (Oliveira et al. 2009) in chronic periodontitis patients. The authors

demonstrated the expression of higher levels of IL-8 mRNA in gingival cells of the diseased patients as well. The methylation status of the *IL8* gene promoter was also observed in two metastatic and two nonmetastatic breast carcinoma cell lines and none of the four CpG sites investigated was found to be methylated in any of the cell lines (De Larco et al. 2003).

Although DNA methylation is recognized for its role in controlling many immune and inflammatory processes, the degree to which a gene undergoes transcriptional silencing will depend on both level of cytosines that are methylated in the CpG islands and their positions within the sequence (Moreira et al. 2007, Johnson & Belshaw 2008).

Hypomethylation status is often associated with the inappropriate over-transcription of genes (Moreira 2007). In the present study it was demonstrated a marked hypomethylated status in the subjects who presented generalized AgP, comparing to the control subjects, in the promoter region of the *IL8* gene. The IL-8 has a wide and important role in the periodontal disease process, for its ability to recruit and activate acute inflammatory cells and it is also regulated by virulence factors produced by bacterial cells (Tomi et al. 2008, Uehara et al. 2008). Possibly, the methylation mechanism presented in this region of the *IL8* gene promoter might be another gear that participates in the disease process and therefore it may be important in the aetiology and pathogenesis of periodontal disease. However, remains the question whether methylation status is altered during AgP due bacterial infection, since it is believed that bacteria have potential to alter DNA methylation, or could represent consequence of the host inflammatory process (Bobetsis et al. 2007).

References

- Ahlquist, T., Lind, G. E., Costa, V. L., Meling, G. I., Vatn, M., Hoff, G. S., Rognum, T. O., Skotheim, R. I., Thiis-Evensen, E. & Lothe, R. A. (2008) Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers. *Molecular Cancer* **7**, 94.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1-6.
- Blanco, D., Vicent, S., Fragaz, M. F., Fernandez-Garcia, I., Freire, J., Lujambio, A., Esteller, M., Ortiz-de-Solorzano, C., Pio, R., Lecanda, F. & Montuenga, L. M. (2007) Molecular analysis of a multistep lung cancer model induced by chronic inflammation reveals epigenetic regulation of p16 and activation of the DNA damage response pathway. *Neoplasia* **9**, 840-852.
- Bobetsis, Y. A., Barros, S. P., Lin, D. M., Weidman, J. R., Dolinoy, D. C., Jirtle, R. L., Boggess, K. A., Beck, J. D. & Offenbacher, S. (2007) Bacterial infection promotes DNA hypermethylation. *Journal of Dental Research* **86**, 169-174.
- Borrell, L. N. & Papapanou, P. N. (2005) Analytical epidemiology of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **32**(Suppl.), 132-158.
- Chang, M. S., Uozaki, H., Chong, J. M., Ushiku, T., Sakuma, K., Ishikawa, S. Hino, R., Barua, R. R., Iwasaki, Y., Arai, K., Fujii, H., Nagai, H. & Fukayama, M. (2006) CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus. *Clinical Cancer Research* **12**, 2995–3002.
- De Larco, J. E., Wuertz, B. R., Yee, D., Rickert, B. L. & Furcht, L. T. (2003) Atypical methylation of the interleukin-8 gene correlates strongly with the metastatic potential of breast carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13988–13993.
- Deng, G., Chen, A., Pong, E. & Kim, Y. S. (2001) Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene* **20**, 7120-7127.

Edwards, T. M. & Myers, J. P. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. (2007) *Environmental Health Perspectives* **115**, 1264-1270.

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P. A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457-463.

Feinberg, A. P. (2007) Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* **447**, 433-440.

Fitzpatrick, D. R. & Wilson, C. B. (2003) Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. *Clinical Immunology* **109**, 37-45.

Furuta, T., Shuto, T., Shimasaki, S., Ohira, Y., Suico, M. A., Gruenert, D. C. & Kai, H. (2008) DNA demethylation-dependent enhancement of toll-like receptor-2 gene expression in cystic fibrosis epithelial cells involves SP1-activated transcription. *BMC Molecular Biology* **21**, 9-39

Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, B. D. & Baylin, S. B. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 9821-9826.

Hodge, D. R., Peng, B., Cherry, J. C., Hurt, E. M., Fox, S. D., Kelley, J. A., David, J. M. & William, L. F. (2005) Interleukin-6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. *Cancer Research* **65**, 4673-4682.

Johnson, J. T. & Belshaw, N. J. (2008) Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 1346-1359.

Kinane, D. F. & Hart, T. C. (2003) Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **14**, 430-449

Liu, Z. J., Wang, G., Cai, Y., Gu, S. Z., Zhang, X. B., Liu, L. & Gao, X. (2009) Androgen receptor CpG island methylation status in human leukemia cancer cells. *Cancer Investigation* **27**, 156-162.

Malekzadeh, K., Sobti, R. C., Nikbakht, M., Shekari, M., Hosseini, S. A., Tamandani, D. K. & Singh, S. K. (2009) Methylation patterns of Rb1 and Casp-8 promoters and their impact on their expression in bladder cancer. *Cancer Investigation* **27**, 70-80.

Marshall, J. C. (2005) Neutrophils in the pathogenesis of sepsis. *Critical Care Medicine* **33**(Suppl.), 502-504.

Moreira, P. R., Lima, P. M. A., Sathler, K. O. B., Imanishi, S. A., Costa, J. E., Gomes, R. S., Gollob, K. J. & Dutra, W. O. (2007) Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clinical & Experimental Immunology* **148**, 119–126.

Offenbacher, S., Barros, S. P. & Beck, J. D. (2008) Rethinking periodontal inflammation. *Journal of Periodontology* **79**(Suppl.), 1577-1584.

Oliveira, N. F. P., Damm, G. R., Andia, D. C., Salmon, C., Nociti, F. H. Jr., Line, S. R. P. & de Souza, A. P. (2009) DNA methylation status of IL8 gene promoter in oral cells of smokers and nonsmokers with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 719–725.

Remick, D. G. (2005) Interlukin-8. *Critical Care Medicine* **33**(Suppl.), 466-467.

Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F. & Cassatella, M. A. (2000) The neutrophils as a cellular source of chemokines. *Immunological Reviews* **177**, 195-203.

Shapira, L., Wilensky, A. & Kinane, D. F. (2005) Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 72–86.

Stenvinkel, P. M., Karimi, M., Johansson, S., Axelsson, J., Suliman, M., Lindholm Heimbürger, B. O., Barany, P., Alvestrand, A., Nordfors, L., Qureshi, A. R., Ekström, T. J. & Schalling, M. (2007) Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation – a novel risk factor for cardiovascular disease? *Journal of International Medicine* **261**, 488-499.

Tomi, N., Fukuyo, Y., Arakawa, S. & Nakajima, T. (2008) Pro-inflammatory cytokine production from normal human fibroblasts is induced by *Tannerella forsythia* detaching factor. *Journal of Periodontal Research* **43**, 136–142.

Tonetti, M. S. & Mombelli, A. (1999) Early-onset periodontitis. *Annals of Periodontology* **4**, 39-52.

Trevilatto, P. C. & Line, S. R. P. (2000) Use o buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *Journal of Forensic Odonto-Stomatology* **18**, 6-9.

Uehara, A., Naito, M., Imamura, T., Potempa, J., Travis, J., Nakayama, K. & Takada, H. (2008) Dual regulation of interleukin-8 production in human oral epithelial cells upon stimulation with gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *Journal Medical Microbiology* **57**, 500–507.

Wilson, A. G. (2008) Epigenetic Regulation of Gene Expression in the Inflammatory Response and Relevance to Common Diseases. *Journal of Periodontology* **79**, 1514-1519.

Table 1. Demographic parameters of the studied population

	<i>Control (n=37)</i>	<i>Generalized AgP (n=37)</i>
Age (years)		
Mean ($\pm$ SD)	28.08 $\pm$ 6.39	28.81 $\pm$ 4.73
Gender		
Female	28 (75.68%)	28 (75.68%)
Male	9 (24.32%)	9 (24.32%)
Ethnic group		
Caucasian	37 (100%)	37 (100%)

AgP indicates aggressive periodontitis

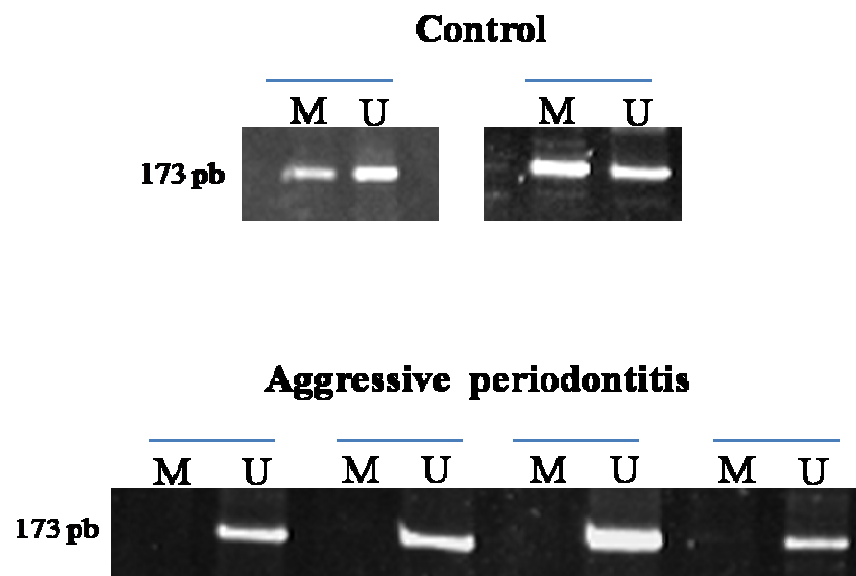


Figure 1 - Methylation-specific PCR of *IL8* gene promoter. The gel shows amplification of 173pb fragment from two control subjects and four subjects with generalized AgP. M, methylated; U, unmethylated.

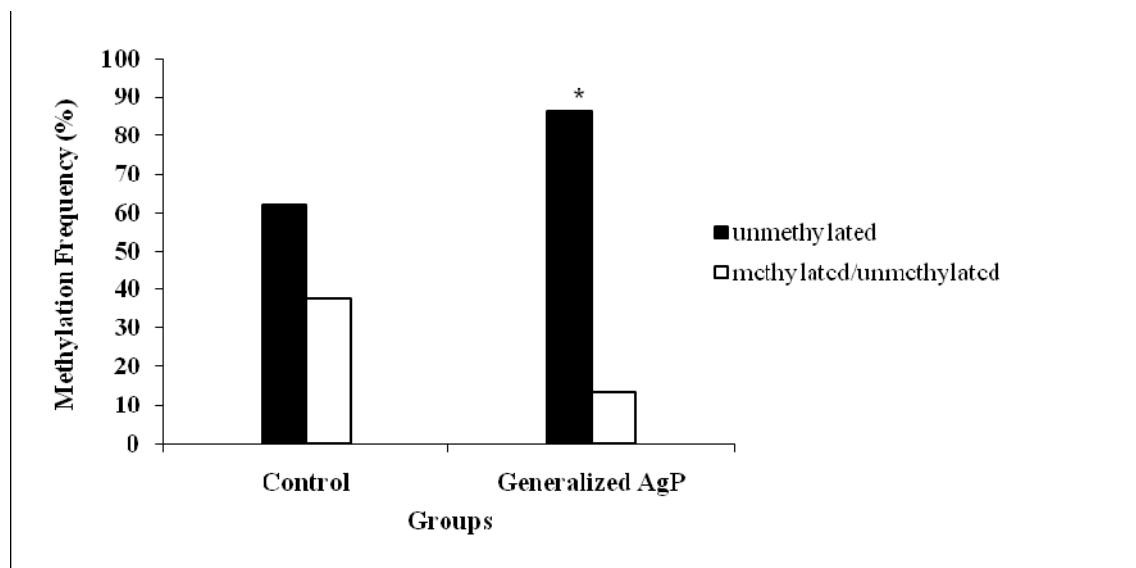


Figure 2 - Methylation frequency of the *IL8* gene promoter in oral epithelial cells of control subjects and subjects with generalized AgP (control group, n= 37caucasian subjects; generalized AgP, n= 37caucasian subjects). * Significant difference ($p=0.016$; χ^2 test).

CONCLUSÕES

Polimorfismo IL8:

1. O genótipo heterozigoto (TA) foi o mais prevalente encontrado na população estudada, tanto para os casos de periodontite crônica quanto para os de periodontite agressiva, no SNP rs4073.

2. O SNP rs4073, localizado no promotor do gene *IL8*, pode estar associado à periodontite crônica generalizada, em indivíduos brasileiros não fumantes, já que se observou um aumento na produção dos transcritos de mRNA da IL-8, na presença da inflamação periodontal. Porém, com relação à periodontite agressiva generalizada, parece não haver esta relação, já que o padrão de transmissão do alelo A, considerado o alelo de risco, e sua combinação em genótipos, são equilibrados na população estudada.

Metilação IL8:

Os indivíduos com periodontite agressiva generalizada apresentaram um padrão de hipometilação nos dinucleotídeos analisados no promotor do gene *IL8*, quando comparados aos indivíduos do grupo controle, nas células epiteliais orais. Sabendo-se que a hipometilação está frequentemente associada a maiores taxas de transcrição gênica, talvez o mecanismo de metilação presente nesta região do gene *IL8* possa ser mais uma engrenagem que participa do processo da doença e, portanto, possa ser importante na etiologia e patogênese da doença periodontal.

REFERÊNCIAS*

Ahlquist T, Lind GE, Costa VL, Meling GI, Vatn M, Hoff GS *et al.* Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers. *Mol Cancer*. 2008; 7: 94.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da célula*. São Paulo: Editora Artmed; 2004.

Allis D, Jenuwein T, Reinberg D. *Epigenetics.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.

Anway MD, Leathers C, Skinner MK. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology*. 2006; 147(12): 5515–23.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1): 1-6.

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(16): 2395-402.

Blanco D, Vicent S, Fragaz MF, Fernandez-Garcia I, Freire J, Lujambioz A *et al.* Molecular analysis of a multistep lung cancer model induced by chronic inflammation reveals epigenetic regulation of p16 and activation of the DNA damage response pathway. *Neoplasia*. 2007; 9(10): 840-852.

Chang MS, Uozaki H, Chong JM, Ushiku T, Sakuma K, Ishikawa S *et al.* CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(10): 2995–3002.

Consensus Report: Chronic Periodontitis. *Annals of Periodontology* 1999; 4(1); 38.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Deng G, Chen A, Pong E, Kim YS. Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene*. 2001; 20(48): 7120-7127.

Dhasarathy A, Wade PA. The MBD protein family—Reading an epigenetic mark?

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004; 429(6990): 457-463.

Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(2): 143-53.

Flemmig TS. Periodontitis. *Annals of Periodontology*. 1999; 4(1): 32-37.

Fukushige S, Kondo E, Horii A. Methyl-CpG targeted recruitment of p300 reactivates tumor suppressor genes in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 379(4): 1021-6.

Furuta T, Shuto T, Shimasaki S, Ohira Y, Suico MA, Gruenert DC *et al*. DNA demethylation-dependent enhancement of toll-like receptor-2 gene expression in cystic fibrosis epithelial cells involves SP1-activated transcription. *BMC Mol Biol*. 2008; 21: 9-39.

Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez GI. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer*. 2007; 7: 70.

Goverdhan SV, Ennis S, Hannan SR, Madhusudhana KC, Cree AJ, Luff AJ *et al*. Interleukin-8 promoter polymorphism -251A/T is a risk factor for age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2008; 92(4): 537-540.

Henikoff S, Matzke MA. Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends Genet*. 1997; 13(8): 293-295.

Hull J, Ackerman H, Isles K, Usen S, Pinder M, Thomson A *et al.* Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am J Hum Genet.* 2001; 69(2): 413–419.

Johnson JT, Belshaw NJ. Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(4): 1346-1359.

Kamali-Sarvestani E, Aliparasti MR, Atefi S. Association of interleukin-8 (IL-8 or CXCL8) -251T/A and CXCR2 +1208C/T gene polymorphisms with breast cancer. *Neoplasma.* 2007; 54(6): 484-489.

Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005; 39: 91–117.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(4): 253-266.

Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002; 18(11): 1427-1431.

Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009; 462(7271): 315-22.

Liu ZJ, Wang G, Cai Y, Gu SZ, Zhang XB, Liu L *et al.* Androgen receptor CpG island methylation status in human leukemia cancer cells. *Cancer Invest.* 2009; 27(2): 156-162.

Malekzadeh K, Sobti RC, Nikbakht M, Shekari M, Hosseini SA, Tamandani DK *et al.* Methylation patterns of Rb1 and Casp-8 promoters and their impact on their expression in bladder cancer. *Cancer Invest.* 2009; 27(1): 70-80.

McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A *et al.* Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res.* 2002; 62(12): 3369-3372.

Oliveira NFP, Damm GR, Andia DC, Salmon C, Nociti FH Jr., Line SRP *et al.* DNA methylation status of IL8 gene promoter in oral cells of smokers and nonsmokers with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(9): 719–725.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GH, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 216-248.

Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene.* 2001; 269(1-2): 1-12.

Remick DG. Interlukin-8. *Crit Care Med.* 2005; 33 Suppl 12: 466-467.

Roach HI, Yamada N, Cheung KSC, Tilley S, Clarke NMP, Oreffo ROC, Kokubun S, Bronner F. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(10): 3110-3124.

Russo AL, Thiagalingam A, Pan H, Califano J, Cheng KH, Ponte JF *et al.* Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stage-specific tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(7): 2466-2470.

Salnikow K, Costa M. Epigenetic mechanisms of nickel carcinogenesis. *J. Environ. Pathol Toxicol Oncol.* 2000; 19(3): 307–318.

Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J *et al.* MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(18): 1330-1338.

Shiao YH, Crawford EB, Anderson LM, Patel P, Ko K. Allele-specific germ cell epimutation in the spacer promoter of the 45S ribosomal RNA gene after Cr(III) exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 205(3): 290–296.

Shuto T, Furuta T, Oba M, Xu H, Li JD, Cheung J *et al.* Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *FASEB J.* 2006; 20(6): 782-784.

Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP, Toews GB *et al.* Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest.* 1990; 86(6): 1945-53.

Stenvinkel P, Karimi M, Johansson S, Axelsson J, Suliman M, Heimbürger BO *et al.* Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation – a novel risk factor for cardiovascular disease? *J Intern Med.* 2007; 261(5): 488-499.

Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med.* 2002; 4(4): 1-17.

Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet.* 2004; 36(5): 497-501.

Takiguchi M, Achanzar WE, Qu W, Li G, Waalkes MP. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp Cell Res.* 2003; 286: 355–365.

Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1): 39-52.

transcription. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59(2): 241-57.

Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E *et al.* The interleukin-8 (-251A/T) polymorphism is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33(4): 504 -507.

Valinluck V, Sowers LC. Inflammation-Mediated Cytosine Damage: A Mechanistic Link between Inflammation and the Epigenetic Alterations in Human Cancers. *Cancer Res.* 2007; 67(12): 5583-86.

Veurink M, Koster M, Berg LT. The history of DES, lessons to be learned. *Pharm World Sci.* 2005; 27(3): 139–143.

- Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(15): 5293–5300.
- Waterland RA. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *J Nutr.* 2006; 136(6): 1706S–1710S.
- Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL *et al.* Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet.* 2005; 37(8): 853-62.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M. *et al.* Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* 2007; 39(4): 457-66.
- Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science.* 1999; 286(5439): 481-486.
- Yucel-Lindberg T, Brunius G. Epidermal growth factor synergistically enhances interleukin-8 production in human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 β . *Arch Oral Biol.* 2006; 51(10): 891-898.
- Zhu JK. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet.* 2009; 43: 143–66.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Análise de metilação no DNA e de transcrição genética dos genes IL-8, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-2, TIMP-3, iNOS, TLR-2, P53 e P21 em células do ligamento periodontal e sangue periférico de indivíduos fumantes e não-fumantes com periodontite crônica e em indivíduos com periodontite agressiva"**, protocolo nº 172/2006, dos pesquisadores Ana Paula de Souza Pardo, Denise Carleto Andia, Gilcy Raymundo Damm e Naila Francis Paulo de Oliveira, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 15/06/2009.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Analysis of DNA methylation and genetic transcription of IL-8, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-2, TIMP-3, iNOS, TLR-2, P53 and P21 in periodontal ligament cells and blood cells of smoking and non-smoking subjects with chronic periodontitis and aggressive periodontitis ."**, register number 172/2006, of Ana Paula de Souza Pardo, Denise Carleto Andia, Gilcy Raymundo Damm and Naila Francis Paulo de Oliveira, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at .

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Análise de polimorfismos genéticos no promotor do gene da Interleucina-8 (IL-8) em indivíduos com periodontite crônica e dos genes da IL-8 e Metaloproteinases 1 e 3 (MMP-1 e MMP-3) em indivíduos com periodontite agressiva generalizada"**, protocolo nº 095/2007, dos pesquisadores Denise Carleto Andia, Ana Paula de Souza Pardo e Darcy de Oliveira Tosello, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 23/02/2009.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Genetic polymorphism analysis in the promoter region of the Interleukin-8 (IL-8) gene in chronic periodontal patients and IL-8, MMP-1 e MMP-3 genes in aggressive generalized periodontitis patients"**, register number 095/2007, of Denise Carleto Andia, Ana Paula de Souza Pardo and Darcy de Oliveira Tosello, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at .

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.





TERMO DE INFORMAÇÃO E CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA CIENTÍFICA



**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES
DAS METALOPROTEINASES 1 E 3 (MMP-1 E MMP-3) EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE
AGRESSIVA GENERALIZADA.**

1. INTRODUÇÃO: Leia este termo cuidadosamente, pois o mesmo visa convidá-lo a participar de uma pesquisa, sendo que as informações a seguir irão descrever esta pesquisa e a sua função nela como participante. Caso tenha qualquer dúvida sobre este estudo ou termo, você deverá esclarecê-la com os pesquisadores responsáveis pelo trabalho que estarão apresentando este termo a você: Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo ou a doutoranda Denise Carleto Andia, do Departamento de Morfologia da FOP/UNICAMP; Fone: (19) 2106-5214/ 2106-5381.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO DA PESQUISA: Esta pesquisa terá como objetivo estudar alguns polimorfismos genéticos (alterações em alguns pontos do DNA, que é a molécula que guarda nossas informações dentro da célula) encontrados em alguns genes ligados à destruição tecidual durante a doença periodontal, que são problemas de gengiva que podem levar à perda dos dentes. **Você deve decidir se deseja ou não colaborar com esta pesquisa, entendendo-a o suficiente para fazer uma decisão consciente.** Este tipo de pesquisa é importante e justificável porque trará avanços no conhecimento da história da doença periodontal que poderão contribuir no futuro com avanços no tratamento da periodontite.

DESCRIÇÃO DOS PARTICIPANTES: Irão participar deste estudo pacientes adultos, do sexo feminino e masculino, com idade entre 18 e 35 anos, não-fumantes (nunca fumaram), que apresentam doença periodontal agressiva generalizada e que estejam em tratamento periodontal na Clínica de

Especialização em Periodontia da FOP-UNICAMP. Não haverá nenhum custo adicional ao paciente decorrente da pesquisa.

DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS: Serão coletadas células de um bochecho com dextrose a 3% (um açúcar) autoclavada (solução estéril). O exame clínico e radiográfico, necessários à classificação da doença periodontal do paciente, serão os mesmos já realizados pelo Cirurgião Dentista que está tratando o paciente, portanto, o paciente não deverá comparecer à clínica exclusivamente por conta da pesquisa. No laboratório do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP - Unicamp, o DNA destas células será purificado e analisado por uma técnica chamada PCR/RFLP, que detecta possíveis modificações na sequência do DNA das células (o material coletado do paciente pelo bochecho). Se alterações forem encontradas, **elas não irão significar doença**, apenas variações entre os indivíduos que poderão indicar quem possui pré-disposição à doença periodontal ou quem possui pré-disposição à proteção contra a doença periodontal. Os resultados encontrados nas células dos indivíduos participantes da pesquisa serão então comparados para sabermos se existem diferenças significantes entre quem apresenta periodontite e quem não apresenta periodontite. Haverá a participação de um grupo controle que será formado por indivíduos que apresentam ótimas condições de saúde bucal e portanto não apresentam a doença periodontal. Não há a possibilidade de inclusão em grupo placebo nem a possibilidade de métodos alternativos para a obtenção dos resultados.

DESCONFORTO, RISCOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS: Os procedimentos da pesquisa não geram riscos ou desconfortos significativos à saúde do paciente. O paciente e o cirurgião dentista responsável pelo tratamento poderão se beneficiar com a possibilidade de receber o diagnóstico genético previsto na pesquisa. Porém, o voluntário poderá optar abaixo em receber ou não este diagnóstico. O tratamento periodontal proposto pelo dentista não será modificado pelos resultados da pesquisa. O maior benefício esperado será a melhor compreensão dos eventos moleculares e dos mecanismos que tornam a doença periodontal uma doença de risco tão grave à gengiva, ao periodonto e, conseqüentemente, aos dentes. Uma vez conhecido este mecanismo, novas estratégias terapêuticas poderão ser abordadas para tratar e até mesmo prevenir a destruição do periodonto. Não há benefício direto ao voluntário da pesquisa.

() Sim, desejo receber meu diagnóstico genético. Neste caso, fica a critério do paciente informar o diagnóstico genético ao cirurgião dentista que o trata.

() Não, não desejo receber meu diagnóstico genético

EXCLUSÕES: Pacientes com história de diabetes; mulheres grávidas ou em lactação; pessoas com história de hepatite ou infecção por HIV, história de sangramento ou discrasias sanguínea, ou com pré-medicação antibiótica recente ou uso crônico de drogas antiinflamatórias serão excluídos da pesquisa, pois estes fatores mascaram os dados analisados. Caso no decorrer da pesquisa se identifique pacientes com estes perfis que ainda não se encontrem em tratamento, estes serão encaminhados para tratamento competente.

CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS: A identificação das amostras será realizada utilizando números e não os nomes dos pacientes. Os resultados desta pesquisa serão apresentados em congressos científicos, porém a identidade dos participantes não será divulgada nessas apresentações, o mesmo ocorrendo em eventuais publicações. Os resultados identificados somente serão liberados ao voluntário e ao dentista responsável pelo tratamento, se de acordo com a vontade do voluntário.

DIREITO DE PARTICIPAR, RECUSAR OU SAIR: Sua participação neste estudo é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda dos benefícios aos quais de outra forma tenha direito, inclusive com relação ao seu tratamento odontológico.

ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA E GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS: Os voluntários poderão ter acesso ao andamento da pesquisa e serão esclarecidos sempre que necessário sobre dúvidas a respeito da pesquisa no telefone de contato das pesquisadoras Ana Paula de Souza Pardo ou Denise Carleto Andia, abaixo informados.

GARANTIA DE RESSARCIMENTO, INDENIZAÇÃO E REPARAÇÃO DE DANOS: Sempre que o voluntário necessitar vir até a FOP/UNICAMP exclusivamente devido à pesquisa será ressarcido com seus gastos com transporte no valor referente ao passe de ônibus (ida e volta). Não prevemos nenhum dano ou risco ao paciente decorrente da pesquisa e, portanto, não há previsão de indenização.

BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO: Este material poderá ser utilizado para pesquisa de outros genes em outras pesquisas, mas você será comunicado e novo TCLE será obtido. Você pode concordar ou não com esta condição:

() Sim, concordo em permitir que o material biológico, que será coletado com meu consentimento, faça parte de um Banco de Material Biológico.

() Não, não permito que o material biológico, que será coletado com meu consentimento, faça parte de um Banco de Material Biológico.

VOCÊ ESTARÁ RECEBENDO UMA CÓPIA DESTE TERMO ASSINADA POR VOCÊ E POR UM DOS PESQUISADORES RESPONSÁVEIS.

CONTATOS: Em caso de dúvida sobre a pesquisa, entrar em contato com a Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo e/ou com a aluna de pós-graduação Denise Carleto Andia no Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, Av. Limeira 901, Piracicaba-SP. Fone: (019) 2106-5214. E-mail: denise@fop.unicamp.com.br

Em caso de dúvida sobre seus direitos como voluntário da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOP/Unicamp, Fone (019) 2106-5349, Home Page www.fop.unicamp.br/cep, E-mail: cep@fop.unicamp.br

Recebi informações para participação em pesquisa científica que me foi explicado dentro da minha compreensão. Também tirei minhas dúvidas sobre este estudo com o pesquisador até minha completa satisfação. Sei que minha participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento sem penalidade e sem prejudicar ou influenciar os resultados do estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento e também autorizo a liberação dos dados obtidos da pesquisa aos pesquisadores e para publicação em revistas científicas e congressos. **Não assine este termo se não teve a oportunidade de solucionar suas dúvidas e recebido respostas satisfatórias a todas elas.**

Piracicaba, ____ de _____ de 20 ____.

RG

Telefone

Assinatura do paciente



TERMO DE INFORMAÇÃO E CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA CIENTÍFICA



ANÁLISE DE METILAÇÃO NO DNA E DE TRANSCRIÇÃO GENÉTICA DOS GENES IL8, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, TIMP2, TIMP3, iNOS, TLR-2, P53 e P21 EM CÉLULAS BUCAIS E SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS FUMANTES E NÃO FUMANTES COM PERIODONTITE CRÔNICA E INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE AGRESSIVA.

1. INTRODUÇÃO: Leia este termo cuidadosamente, pois o mesmo visa convidá-lo a participar de uma pesquisa, sendo que as informações a seguir irão descrever esta pesquisa e a sua função nela como participante. Caso tenha qualquer dúvida sobre este estudo ou termo, você deverá esclarecê-la com os pesquisadores responsáveis pelo trabalho que estarão apresentando este termo a você: Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo, a doutoranda Denise Carleto Andia ou a doutoranda Naila Francis Paulo de Oliveira, do Departamento de Morfologia da FOP/UNICAMP; Fone: (19) 2106-5214/ 2106-5381.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO DA PESQUISA:

Esta pesquisa terá como objetivo estudar o padrão de metilação (presença do grupo químico CH₃ em alguns pontos do DNA, que é a molécula que guarda nossas informações dentro da célula) encontrados em alguns genes ligados à destruição tecidual durante a doença periodontal, que são problemas de gengiva que podem levar à perda dos dentes. **Você deve decidir se deseja ou não colaborar com esta pesquisa, entendendo-a o suficiente para fazer uma decisão consciente.** Este tipo de pesquisa é importante e justificável porque trará avanços no conhecimento da história da doença periodontal que poderão contribuir no futuro com avanços no tratamento da periodontite. No laboratório este material será analisado por uma técnica chamada de *MSP-PCR* que identifica alterações químicas no DNA (o material coletado do paciente). Se alterações forem encontradas, **elas não irão significar doença**, apenas variações entre os indivíduos que pré-dispõe ao problema na gengiva.

DESCRIÇÃO DOS PARTICIPANTES:

PERIODONTITE AGRESSIVA- Irão participar deste estudo pacientes adultos, do sexo feminino e masculino, com idade entre 18 e 35 anos, não fumantes (nunca fumaram), que apresentam doença periodontal agressiva generalizada e que estejam em tratamento periodontal na Clínica de Especialização em Periodontia da FOP-UNICAMP. Não haverá nenhum custo adicional ao paciente decorrente da pesquisa.

PERIODONTITE CRÔNICA- Participarão deste estudo pacientes do sexo feminino e masculino, adulto com idade entre 25 e 60 anos, fumantes (+ 5 cigarros/dia) e não fumantes (nunca fumaram), que apresentavam doença periodontal crônica em grau moderado a severo e que estavam em tratamento periodontal na Clínica de Especialização em Periodontia da FOP-UNICAMP. Não haverá nenhum custo adicional ao paciente decorrente da pesquisa.

Grupo que o voluntário se enquadra:

- ☐ () controle
- ☐ () periodontite crônica
- ☐ () periodontite agressiva

DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS:

PERIODONTITE AGRESSIVA- Serão coletadas células de um bochecho com dextrose a 3% (um açúcar) autoclavada (solução estéril). O exame clínico e radiográfico, necessários à classificação da doença periodontal do paciente, serão os mesmos já realizados pelo Cirurgião Dentista que está tratando o paciente, portanto, o paciente não deverá comparecer à clínica exclusivamente por conta da pesquisa. No laboratório do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP - Unicamp, o DNA destas células será purificado e analisado pela técnica MSP-PCR, que detecta possíveis alterações químicas no DNA. Se alterações forem encontradas, **elas não irão significar doença**, apenas variações entre os indivíduos que poderão indicar quem possui pré-disposição à doença periodontal ou quem possui pré-disposição à proteção contra a doença periodontal. Os resultados encontrados nas células dos indivíduos participantes da pesquisa serão então comparados para sabermos se existem diferenças significantes entre quem apresenta periodontite e quem não apresenta periodontite. Haverá a participação de um grupo controle que será formado por indivíduos que apresentam ótimas condições de saúde bucal e, portanto,

não apresentam a doença periodontal. Não há a possibilidade de inclusão em grupo placebo nem a possibilidade de métodos alternativos para a obtenção dos resultados.

PERIODONTITE CRÔNICA- Serão coletadas células do instrumental do dentista, 10 mL de sangue venoso da veia radial e um bochecho com dextrose a 3% autoclavada. O sangue servirá como material controle do indivíduo. No laboratório do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP - Unicamp, o DNA destas células será purificado e analisado pela técnica chamada MSP-PCR, que detecta possíveis alterações químicas no DNA. Os resultados encontrados nas células de indivíduos fumantes e não fumantes serão então comparados para sabermos se existem diferenças. Se alterações forem encontradas, **elas não irão significar doença**, apenas variações entre os indivíduos que poderão indicar quem possui pré-disposição à doença periodontal ou quem possui pré-disposição à proteção contra a doença periodontal. Os resultados encontrados nas células dos indivíduos participantes da pesquisa serão então comparados para sabermos se existem diferenças significantes entre quem apresenta periodontite e quem não apresenta periodontite. Haverá a participação de um grupo controle que será formado por indivíduos que apresentam ótimas condições de saúde bucal e, portanto, não apresentam a doença periodontal. Não há a possibilidade de inclusão em grupo placebo nem a possibilidade de métodos alternativos para a obtenção dos resultados.

DESCONFORTO, RISCOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS: Os procedimentos da pesquisa não geram riscos significativos à saúde do paciente. A coleta do material presente no instrumental não gera desconforto ou risco adicional ao indivíduo uma vez que este material é obtido durante o tratamento periodontal (instrumentação). A coleta de sangue não gera riscos graves, mas poderá ser considerada desconfortável para o paciente devido à dor da “picada” da agulha, possibilidade de surgimento de hematomas e equimoses. Esta coleta será realizada por profissional capacitada para coleta de sangue (a mestrande Gilcy Raymundo Damm, formada em Biomedicina) e em local apropriado. O paciente e o cirurgião dentista responsável pelo tratamento poderão se beneficiar com a possibilidade de receber o diagnóstico genético previsto na pesquisa. Porém, o voluntário poderá optar abaixo em receber ou não este diagnóstico. O tratamento proposto não será modificado, mas o paciente poderá ser aconselhado sobre os possíveis malefícios que o fumo esteja causando no DNA de suas células. O maior benefício esperado será a melhor compreensão dos eventos moleculares e dos mecanismos que tornam o fumo um agente de risco à gengiva e periodonto. Uma vez conhecido este mecanismo, novas estratégias terapêuticas poderão ser abordadas para tratar e até mesmo prevenir a destruição do periodonto. O paciente será mais bem esclarecido sobre os malefícios do cigarro e potenciais riscos a que se expõe com o hábito de fumar através de folheto explicativo e/ou palestra educativa.

() Sim, desejo receber meu diagnóstico genético

() Não, não desejo receber meu diagnóstico genético

EXCLUSÕES: Pacientes com história de diabetes; mulheres grávidas ou em lactação; pessoas com história de hepatite ou infecção por HIV, história de sangramento ou discrasias sanguínea, ou com pré-medicação antibiótica recente ou uso crônico de drogas antiinflamatórias serão excluídos da pesquisa, pois estes fatores mascaram os dados analisados. Caso no decorrer da pesquisa se identifique pacientes com estes perfis que ainda não se encontrem em tratamento, estes serão encaminhados para tratamento competente.

CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS: A identificação das amostras será realizada utilizando números e não os nomes dos pacientes. Os resultados desta pesquisa serão apresentados em congressos científicos, porém a identidade dos participantes não será divulgada nessas apresentações, o mesmo ocorrendo em eventuais publicações. Os resultados identificados somente serão liberados ao voluntário e ao dentista responsável pelo tratamento, se de acordo com a vontade do voluntário.

DIREITO DE PARTICIPAR, RECUSAR OU SAIR: Sua participação neste estudo é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda dos benefícios aos quais de outra forma tenha direito, inclusive com relação ao seu tratamento odontológico.

ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA E GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS: Os voluntários poderão ter acesso ao andamento da pesquisa e serão esclarecidos sempre que necessário sobre dúvidas a respeito da pesquisa, no telefone de contato das pesquisadoras Ana Paula de Souza Pardo, Denise Carleto Andia ou Naila Francis Paulo de Oliveira, abaixo informados.

GARANTIA DE RESSARCIMENTO, INDENIZAÇÃO E REPARAÇÃO DE DANOS: Sempre que o voluntário necessitar vir até a FOP/UNICAMP exclusivamente devido à pesquisa será ressarcido com seus gastos com transporte no valor referente ao passe de ônibus (ida e volta). Não prevemos nenhum dano ou risco ao paciente decorrente da pesquisa e, portanto, não há previsão de indenização.

BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO: Este material poderá ser utilizado para pesquisa de outros genes em outras pesquisas, mas você será comunicado e novo TCLE será obtido. Você pode concordar ou não com esta condição:

() Sim, concordo em permitir que o material biológico, que será coletado com meu consentimento, faça parte de um Banco de Material Biológico.

() Não, não permito que o material biológico, que será coletado com meu consentimento, faça parte de um Banco de Material Biológico.

VOCÊ ESTARÁ RECEBENDO UMA CÓPIA DESTE TERMO ASSINADA POR VOCÊ E POR UM DOS PESQUISADORES RESPONSÁVEIS.

CONTATOS: Em caso de dúvida sobre a pesquisa, entrar em contato com a Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo e/ou com a aluna de pós-graduação Denise Carleto Andia ou Naila Francis Paulo de Oliveira no Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, Av. Limeira 901, Piracicaba-SP. Fone: (019) 2106-5214. E-mail: denise@fop.unicamp.com.br / naila_francis@yahoo.com.br

Em caso de dúvida sobre seus direitos como voluntário da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOP/Unicamp, Fone (019) 2106-5349, Home Page www.fop.unicamp.br/cep, E-mail: cep@fop.unicamp.br

Recebi informações para participação em pesquisa científica que me foi explicado dentro da minha compreensão. Também tirei minhas dúvidas sobre este estudo com o pesquisador até minha completa satisfação. Sei que minha participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento sem penalidade e sem prejudicar ou influenciar os resultados do estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento e também autorizo a liberação dos dados obtidos da pesquisa aos pesquisadores e para publicação em revistas científicas e congressos. **Não assine este termo se não teve a oportunidade de solucionar suas dúvidas e recebido respostas satisfatórias a todas elas.**

Piracicaba, ____ de _____ de 200_.

_____ RG

Telefone

Assinatura do paciente

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP

Nº amostra: _____

Nome: _____

Sexo: F M Idade: _____ Cor: M P B

Endereço: _____

Cidade: _____ Profissão: _____

Tel: _____ CEL: _____

DADOS CLÍNICOS SOBRE SAÚDE GERAL

Doença Crônica ? S N (não aceitar diabetes) Qual? _____

Diabete na família? S N

Fumante? S N (não aceitar ex-fumante por mais de 5 anos)

Fumante Passivo? S N

Quantos cigarros por dia? _____ (mínimo 5)

Há quanto tempo fuma? _____ (mínimo 5)

DADOS PERIODONTAIS

Quantos dentes? _____

Direito

Esquerdo

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

Maior Sondagem: _____ (mínimo 5 mm)

Histórico

Câncer? S N Qual? _____

Câncer na Família? S N Qual? _____

Freqüência de Doença Periodontal _____

Doença Periodontal na família? S N Freqüência _____

Fumante na Família? S N

OBSERVAÇÕES:

Estado periodontal: leve () moderado () avançado ()

Sangramento Gengival S N

Tártaro: S N

De: onbehalfof+cpeedoffice+wiley.com@manuscriptcentral.com em

nome de cpeedoffice@wiley.com

Enviado em: sexta-feira, 15 de janeiro de 2010 15:15

Para: denise@andia.com.br

Assunto: Manuscript ID CPE-01-10-2430 - Journal of Clinical Periodontology

15-Jan-2010

Dear Ms. Denise Andia,

Your manuscript entitled "DNA methylation status of the IL8 gene promoter in aggressive periodontitis." has been successfully submitted online. Within the next few days your manuscript will be checked for its compliance with the journal's requirements. If any required part is found missing, you will be notified by email that your manuscript has been

unsubmitted and returned to your author centre. The email will include detailed explanation of the changes to be made before your manuscript can be resubmitted for review in Journal of Clinical Periodontology.

Your manuscript ID is CPE-01-10-2430.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when contacting the editorial office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) at <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>.

Please note that authors receive a 25% discount on all Wiley books. Just follow this link to register for your book discount now: <http://www.wiley.com/WileyCDA/Section/id-302237.html>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Clinical Periodontology.

Yours sincerely,

Rosie Ledger

Journal of Clinical Periodontology Editorial Office