



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE SAÚDE E BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – PERIODONTIA

SÉRGIO BRAGA FARHAT

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE
DA INTERLEUCINA-6 (*IL6*) E A PERIODONTITE CRÔNICA**

CURITIBA

2013

SÉRGIO BRAGA FARHAT

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE
DA INTERLEUCINA-6 (*IL6*) E A PERIODONTITE CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Área de concentração em Periodontia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Mara Luczyszyn
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Cristina Trevilatto

CURITIBA

2013

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

F223e 2013	<p>Farhat, Sérgio Braga</p> <p>Estudo de associação entre polimorfismos no gene da interleucina-6 (IL6) e a periodontite crônica / Sérgio Braga Farhat ; orientadora Sonia Mara Luczyszyn ; co-orientadora, Paula Cristina Trevilatto. – 2013. 54 f. : il. ; 30 cm</p> <p>Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2013. Inclui bibliografias Texto em português e inglês</p> <p>1. Polimorfismo (Genética). 2. Periodontite crônica. 3. Interleucina-6. 4. Odontologia. I. Luczyszyn, Sonia Mara. II. Trevilatto, Palula Cristina. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.</p>
CDD 20. ed. – 617.6	



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

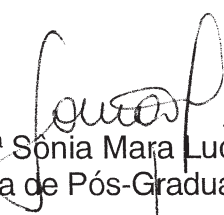
TERMO DE APROVAÇÃO


SÉRGIO BRAGA FARHAT

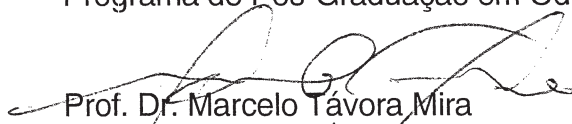
ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE DA INTERLEUCINA-6 (IL6) E A PERIODONTITE CRÔNICA


Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Periodontia**.

Orientador (a):


Prof.ª Dr.ª Sônia Mara Luczyszyn
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof.ª Dr.ª Paula Cristina Trevilatto
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Marcelo Távora Mira
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, PUCPR


Prof.ª Dr.ª Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo
Programa de Pós-Graduação em Genética, UFPR


Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UEPG

Curitiba, 05 de julho de 2013.

DEDICATÓRIA

Anninha, a você que ilumina meus dias, que a cada dia faz de mim uma pessoa melhor, minha maior incentivadora, amiga, companheira de todas as horas. A você que acredita em meus valores e sempre me faz olhar em frente. A você que me deu meus dois maiores presentes, eu só tenho a dizer: Obrigado, te amo.

Fi, meu amigo, meu orgulho, companheiro de poucas palavras e de um coração enorme, agradeço a Deus todos os dias por este convívio tão importante para mim. Obrigado por sua sensibilidade, por sua serenidade, por sua amizade, adoro você. Saiba sempre que você é uma pessoa muito importante na minha vida.

Flá, meu doce, meu oásis neste mundo de tantos desertos. Obrigado por tornar os meus dias mais suaves com suas músicas, com seu humor e sua inteligência. Obrigado por me fazer enxergar a vida de uma janela diferente, através de um vidro sempre azul, lindamente indescritível...

Aos meus pais **Alice** e **Issam**, não tenho palavras para um momento como este. Impossível traduzir a gratidão por tantos exemplos, por tanto amor! Tenho orgulho de vocês, meus melhores amigos! Meus maiores parceiros e incentivadores. Um enorme beijo nos seus corações... Que Deus os abençoe sempre. Devo a vocês tudo que consegui nesta vida

Aos meus poucos, mas adoráveis irmãos **Marcos, Filipe, Mísia, Ciro, Gabriel, Clarice, Riad, cunhadas, cunhados, agregados e sobrinhos** (isso dá outra tese...) obrigado pela alegria desta sempre barulhenta e adorável família. Amo vocês.

Dedico este trabalho a vocês, razão da minha vida, meus amores eternos.

Que Deus os abençoe e proteja sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais esta oportunidade em minha vida. Foram quatro anos de luta, aprendizado e dedicação. Não foi fácil superar as minhas enormes limitações e sentar novamente em um banco escolar após os cinquenta anos de idade, mas tudo faz parte da nossa evolução. Peço neste momento que abençoe a todos os meus familiares, amigos e a todos os pacientes e funcionários que tornaram possível a realização deste trabalho.

Aos professores **Dr^a. Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo**, da Universidade Federal do Paraná e **Dr. Gibson Luiz Pilatti** da Universidade Estadual de Ponta Grossa por terem gentilmente aceito o convite a participar da minha banca de defesa de tese. Sinto-me muito honrado e prestigiado com as vossas presenças. Muito obrigado.

À **Prof^a. Márcia Olandoski** por seu incansável trabalho estatístico, sempre em busca da perfeição. Obrigado pela boa vontade de todas as horas, sobretudo pela rapidez na disponibilização dos resultados das muitas tabelas por nós solicitadas. Obrigado pelo carinho e educação com que sempre me recebeu.

À querida mestrandia **Geovana Brotto Ramos** pelo incansável auxílio, paciência, boa vontade e por ter sempre um tempinho para mim. Sem você eu ainda estaria literalmente patinando em planilhas Haploview e SPSS...
Valeu Ge!

À **Dr^a. Renata Y. Werneck** pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos e eternos professores **Dr. Sung H. Kim**, **Dr. Vinícius Tramontina**, **Dr^a. Vula Papalexou** e **Prof^a Rosângela M. Paese**, obrigado pelo convite a participar deste Doutorado, pelo convívio fraterno e por esta oportunidade inesquecível na minha carreira profissional.

Ao **Prof. Dr. Hamilton Coser**, meu companheiro de todas as horas, meu mestre insuperável. Agradeço seu exemplo ímpar de luta, provando a todos que tudo é possível com trabalho e dedicação, onde a trajetória do cabo da enxada ao Doutorado e à Docência sempre foi regada com muito otimismo e bom humor. Obrigado pelas eternas lições.

Ao **Dr. Othon Brasil Palhares** pelo incentivo, companheirismo e pelos constantes ensinamentos clínico-científicos que sempre me passou.

À minha querida colega **Kamille**, *expert* em manipulação de *Rattus norvegicus albinus*! Obrigado pelos momentos felizes que passamos juntos, coletando material clínico, examinando pacientes e trabalhando nos laboratórios. Você sempre foi um grande incentivo, obrigado por tanto carinho! Que Deus te ilumine sempre.

Aos professores, funcionários e pacientes da PUC-PR meu eterno agradecimento por me acolherem com tanto amor e me proporcionarem este crescimento profissional e pessoal.

À querida **Neide**, secretária da Pós Graduação por seu carinho e competência no atendimento a nós alunos, meu eterno agradecimento.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha doce orientadora **Prof^a. Dr^a. Sonia Mara Luczyszyn**, minha irmã, companheira, amiga com todas as letras. Poucas pessoas sabem ser grandes sem aparecer, brilhar sem ofuscar, ensinar muito mais do que uma simples pesquisa de Doutorado. Obrigado por seu exemplo de humildade, de companheirismo, por ter me compreendido dentro das minhas limitações. Sem você o mundo seria muito triste!

À **Prof^a. Dr^a. Paula Cristina Trevilatto** meu mais sincero respeito e admiração por tudo que seu nome representa na ciência, por seu pioneirismo nos estudos genéticos. Paula, muitíssimo obrigado por ter me recebido em sua equipe, por ter me colocado em mãos tão seguras e competentes e ter acreditado em meu trabalho. Saiba que tenho muito orgulho de ter sido seu companheiro de pesquisa em uma área tão difícil e árdua.

Ao mestre e amigo **Prof. Dr. Cléber Machado de Souza**, meu enorme agradecimento pelo carinho e paciência de todas as horas, pelas aulas teóricas e práticas, por “carregar esse piano” do nosso “lab”. Ao longo destes quatro anos você marcou presença incondicional na minha carreira. Que Deus o abençoe sempre junto a seus filhos maravilhosos, que tive o prazer de ver nascer durante minha tese. Você será sempre um exemplo de dedicação e persistência em minha vida. Muito obrigado por ser meu amigo.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Távora Mira**:

Amigo, a você que me acolheu com tanto carinho, que me convidou a participar do seu *meeting* semanal, que durante quatro anos seguidos teve uma paciência e dedicação que vão muito além do que eu poderia imaginar e merecer, a você que carinhosamente me chama de *buddy*, (mesmo sabendo que esse é o nome do meu cachorro!), eu lhe sou eternamente grato. Minhas limitações não me permitiram virar um geneticista, mas graças a você consigo “digerir” um artigo de estudo de associação genética com segurança e, acima de tudo, com a visão crítica que você tanto nos ensina.

Tem certas coisas que o coração sente e que as palavras não conseguem exprimir, sendo assim eu lhe digo apenas: obrigado amigo!

*“Não fosse pela enorme variabilidade
entre os indivíduos, a medicina seria
apenas uma ciência e não uma arte.”*

Sir William Osler, 1892

Médico

Resumo

A periodontite crônica é uma doença inflamatória infecciosa multifatorial, com uma forte influência genética e ambiental em seu fenótipo. A interleucina-6 é uma citocina pleiotrópica que exerce uma função reguladora em processos inflamatórios em geral e especialmente na periodontite. Nas últimas décadas tem havido vários estudos importantes de associação genética entre polimorfismos no gene *IL6* e a periodontite crônica, com um foco especial em sua região promotora. Neste estudo, realizou-se através de uma moderna abordagem, um mapeamento físico completo do gene *IL6* em uma amostra populacional da região Sul do Brasil. Um total de 109 indivíduos de ambos os sexos, com média de idade de $41,5 \pm 8,5$ anos foi dividido em um grupo caso composto por 56 indivíduos com periodontite crônica e um grupo controle de 53 indivíduos com saúde periodontal. Após a coleta e purificação de DNA, nove tag SNPs foram avaliados, abrangendo todo o gene: rs1524107, rs2069835, rs2069837, rs2069838, rs2069840, rs2069842, rs2069843, rs2069845 e rs2069849, segundo o *International HapMap Project*, por PCR em tempo real. Verificou-se que o marcador rs2069837 no modelo dominante para G (localizado no segundo íntron do *IL6*) foi associado com a proteção contra a periodontite crônica na população estudada, na presença de variáveis clínicas tais como placa visível, frequência de visita ao dentista e uso de fio dental, tendo sido sugerido, pela primeira vez, como um marcador de suscetibilidade à periodontite crônica.

Palavras-chave: Polimorfismo de base única, tag SNP, periodontite crônica, interleucina-6.

Abstract

Chronic periodontitis (CP) is a complex infectious inflammatory disease with a strong genetic and environmental influence on its phenotype. Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine that exerts a clear regulating role in inflammatory processes in general and especially in periodontitis. In recent decades we have seen several important genetic association studies between polymorphisms of *IL6* gene and chronic periodontitis, with a special focus on its promoter region. In this study, for the first time, we perform a modern approach, targeting a complete physical mapping of the gene *IL6* in a southern Brazilian population sample. A total of 109 individuals both sexes, mean age 41.5 ± 8.5 years were divided into a case group, composed of 56 subjects with CP, and a control group of 53 individuals clinically characterized as CP free. After DNA collection and purification, nine tag SNPs were evaluated, covering the entire gene: rs1524107, rs2069835, rs2069837, rs2069838, rs2069840, rs2069842, rs2069843, rs2069845 and rs2069849, following the International HapMap Project, by real time PCR. It was found that marker rs2069837 (located in the second intron of *IL6*) under G dominant was associated with protection against chronic periodontitis in a Brazilian population in the presence of clinical variables, such as visible plaque, dentist visit frequency and dental floss use and suggested for the first time as a marker of susceptibility to CP.

Key-words: Single nucleotide polymorphism, tag SNP, chronic periodontitis, interleukin-6.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Análise de tag SNPs e análise de desequilíbrio de ligação do gene <i>IL6</i>	30
------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínico-demográficas da população.....	27
Tabela 2 – Condições periodontais da população.....	28
Tabela 3 – Análise genotípica dos nove tag SNPs.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>IL6</i>	gene da proteína interleucina-6
PC	periodontite crônica
IL-6	proteína interleucina-6
DNA	ácido desoxirribonucléico
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
PCR	reação em cadeia da polimerase
PA	periodontite agressiva
Ig	imunoglobulina
CMSP	células mononucleares do sangue periférico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
et al.	e colaboradores
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
PS	profundidade de sondagem
NIC	nível de inserção clínica
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IG	índice gengival
IP	índice de placa
rpm	rotações por minuto
min.	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
Tris	hidroximetil aminometano
HCl	ácido clorídrico
pH	potencial hidrogeniônico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
SDS	dodecil sulfato de sódio
μl	microlitro
mg	miligramas
°C	graus Celcius
M	molar
Nov	novembro

YRI	Yoruba
DL	desequilíbrio de ligação
Fig.	figura
UTR	região não traduzida
Dom	dominante
Add	aditivo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
MÉTODOS	16
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	23
TABELA 1	27
TABELA 2	28
TABELA 3	29
FIGURA 1	30
ANEXO 1 Análise genotípica completa.....	31
ANEXO 2 Análise Multivariada.....	32
ANEXO 3 Prontuário.....	34
ANEXO 4 Periograma.....	37
ANEXO 5 Índices.....	38
ANEXO 6 Artigo	39

Introdução

A periodontite é uma doença inflamatória que causa destruição dos tecidos de suporte dos dentes, com alta prevalência, sendo classificada em duas categorias gerais: periodontite crônica (PC) e periodontite agressiva (PA).¹

Na periodontite crônica, a destruição dos tecidos periodontais é mediada pela resposta do hospedeiro induzida por bactérias,² envolvendo complexas interações entre as células e a matriz extracelular, mediadas em grande parte por citocinas.³ As citocinas são proteínas solúveis que se ligam a receptores específicos em células alvo, ativando cascatas intracelulares, muitas vezes resultando em alterações fenotípicas.⁴ Elas regulam a amplitude e a duração da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro.⁵

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina multifuncional, com amplo papel na reação inflamatória e resposta imune humoral e celular, constituindo, assim, um mediador primordial da resposta do hospedeiro a injúrias e infecções.⁶ A IL-6 está envolvida na proliferação de células T⁷ e na diferenciação e ativação de células B, secretoras de imunoglobulina (Ig).⁸ Diversas situações clínicas resultam no aumento da produção de IL-6, como lesão tecidual, condições malignas, infecções, reações de hipersensibilidade, e doenças auto-imunes,^{6,9} tais como, artrite reumatóide¹⁰ e psoríase.¹¹

A IL-6 é uma potente estimuladora da diferenciação de osteoclastos e da reabsorção óssea.¹² Nos pacientes com periodontite, grande quantidade de IL-6 é produzida localmente, sendo expressa por muitas células na lesão periodontal, sugerindo um papel na sua imunopatogênese.^{13,14} Dados experimentais sugerem que as células mononucleares do sangue periférico estimuladas por lipopolissacarídeos são induzidas a um padrão diferente de liberação de IL-6 em indivíduos com periodontite, quando comparados com as células de indivíduos saudáveis.¹⁵

Reconhecendo a importância do seu papel em doenças inflamatórias, a IL-6 tem sido considerada como um útil indicador ou marcador de diagnóstico para a doença periodontal.¹⁶ Está presente em níveis elevados nos tecidos inflamados,¹⁷ fluido crevicular gengival e plasma de pacientes com periodontite.¹⁸ No entanto, uma redução significativa do seu nível sérico tem sido observada após terapia periodontal.¹⁹ Em pacientes periodontais, foi

reportada uma alta expressão de RNAm da *IL6* em tecidos doentes quando comparada a tecidos saudáveis.²⁰

O aumento na suscetibilidade a danos nos tecidos inflamatórios foi ligado à capacidade individual para produzir altos níveis de IL-6. Sugere-se que este padrão de resposta a estímulos ambientais seja determinado geneticamente e possa predispor a desordens inflamatórias crônicas, como demonstrado por Fishman et al. (1998).²¹ Evidências indicam que o risco de se desenvolver periodontite, assim como a idade do seu aparecimento e sua gravidade, é afetado por fatores genéticos e ambientais.²² Tal variabilidade individual parece ser regulada por variações comuns de nucleotídeos no gene *IL6*, localizado no braço curto do cromossomo 7.^{21,23}

Em 2003, um estudo de Trevisatto et al. revelou evidência de associação entre o polimorfismo *IL6* -174 (G>C) e a suscetibilidade à periodontite crônica severa em uma população Brasileira, sugerindo um efeito protetor para o alelo C.²⁴ Vários estudos subsequentes investigaram o papel das variantes do gene *IL6* nas doenças periodontais. Especificamente o polimorfismo *IL6* -174 tem sido extensivamente avaliado tanto em periodontite crônica como na agressiva, contudo, com resultados contraditórios: enquanto evidências positivas para essa associação foram detectadas em amostras populacionais brasileira,^{25,26} indiana^{27,28} e britânica,^{23,29} estudos realizados em amostras populacionais checa,³⁰ japonesa,³¹ norte-americana³² e finlandesa³³ não conseguiram detectar o mesmo efeito. Um estudo com uma população alemã encontrou evidências positivas para a associação entre *IL6* -174 e a periodontite, porém, com o genótipo CC associado à periodontite crônica,³⁴ enquanto que na população brasileira referida acima, o alelo C foi associado à proteção, ao invés de suscetibilidade à periodontite crônica.²⁴ Mesmo quando outros marcadores (SNPs) na região promotora foram investigados, o cenário é ainda inconclusivo: um estudo com uma amostra da população checa revelou para *IL6* -572 uma maior frequência de heterozigotos GC no grupo controle, quando comparado ao grupo com periodontite crônica (caso), embora não tenham sido detectadas evidências de associação entre a doença e alelos do *IL6* -597.³⁰ Este mesmo SNP (*IL6* -572) foi associado à periodontite crônica em um estudo chinês, porém, em homozigose (genótipo GG).³⁵ Em contraste, em um grande estudo em uma amostra da população de Londres, subdividida em brancos,

negros e asiáticos, abrangendo periodontite crônica e agressiva, marcadores -174 e -1363 foram associados com a periodontite apenas em caucasianos, enquanto o SNP -572 não foi associado com doença em nenhum grupo étnico. No mesmo estudo, os SNPs -1480 e -6106 foram associados com periodontite agressiva localizada.²³

Tomados em conjunto, estes resultados parecem implicar as variantes genéticas do gene *IL6* no controle da suscetibilidade à periodontite. No entanto, a natureza exata desse efeito genético ainda é amplamente desconhecida. Importante, todos estes trabalhos anteriores concentraram-se em polimorfismos funcionais localizados na região promotora do gene *IL6*, deixando, portanto, uma estratégia mais abrangente, que envolve todo o gene, ainda por ser executada. O objetivo deste trabalho foi estudar a associação entre periodontite crônica e polimorfismos no *IL6*, com base na cobertura física completa do seu locus genético, realizando uma abordagem não enviesada, usando uma amostra populacional do sul do Brasil.

Métodos

População de estudo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), no qual todos os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, após serem informados da natureza do estudo (aprovado sob protocolo 264/10184). Uma amostra de 109 indivíduos do sul do Brasil, de ambos os sexos, média de idade de $41,5 \pm 8,5$ anos, foi selecionada na Clínica Odontológica da PUCPR, dividida em um grupo caso, composto por 56 indivíduos com periodontite crônica, e um grupo controle de 53 indivíduos caracterizados com saúde periodontal. O diagnóstico de periodontite crônica foi feito com base nos parâmetros clínicos: profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC), ambos observados em 4 pontos ao redor de cada dente. Indivíduos com $NIC \geq 5$ em pelo menos 3 dentes, em pelo menos dois quadrantes, foram considerados com doença.³⁶ Todos os diagnósticos de periodontite crônica foram confirmados com exame radiográfico periapical. O grupo controle foi composto por indivíduos sem sinais de periodontite, conforme determinado pela ausência de perda de inserção clínica, e sem locais com $PS > 3$ mm.¹ Os parâmetros

clínicos da população estudada são encontrados na Tabela 1. Pacientes não foram incluídos se apresentaram uso crônico de anti-inflamatórios, histórico de diabetes, hepatite ou HIV, quimioterapia, infecção sistêmica, gravidez, lactação, doenças bucais (exceto cárie ou doença periodontal), periodontite agressiva, uso de aparelhos ortodônticos e presença de doença periodontal necrosante.

Parâmetros clínicos

Indivíduos completaram questionários pessoais, história médica e odontológica, autorrelatando sexo, idade, raça, tabagismo, frequência de escovação, uso de fio dental e frequência de visitas ao dentista (Tabela 1). O exame clínico forneceu informações sobre o número de dentes, profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC), índice gengival (IG)³⁷ e índice de placa (IP).³⁸ As condições periodontais da população estudada estão resumidas na Tabela 2, onde os resultados apresentados referem-se à média de todas as medidas obtidas por sondagem.

Coleta de DNA

Os indivíduos inscritos foram solicitados para bochechar durante um minuto com uma solução de glicose a 3%. Após o bochecho, uma espátula de madeira esterilizada foi utilizada para raspar a mucosa jugal.³⁹ A ponta da espátula foi então agitada dentro da solução de bochecho retida. Células epiteliais bucais foram sedimentadas por centrifugação a 2000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento celular ressuspenso em 1300 µl de tampão de extração [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM EDTA, 0.5% SDS]. Dez µl de proteinase K (20 mg/ml) foram adicionados à solução, sendo deixados durante a noite a 65°C. O DNA foi purificado por adição de acetato de amônio a 10 M, precipitado com isopropanol e ressuspenso com 50 µl de Tris 10mM (pH 7,6) e EDTA 1mM.⁴⁰

Seleção dos marcadores e genotipagem

Marcadores tag SNPs, capturando toda a informação do gene *IL6*, foram selecionados de acordo com a informação disponível no *site* do *International HapMap Project*,⁴¹ *release 24/phase 2_Nov08* (Hapmap.org, 2009). Todos os marcadores selecionados apresentaram uma frequência alélica mínima de 5%

na população YRI (Africana). Um corte de $r^2 \geq 0,8$ da população YRI foi considerado para definir o desequilíbrio de ligação (DL). Após a aplicação dos critérios acima, 9 tag SNPs, capturando toda a informação do gene *IL6* foram selecionados para genotipagem: rs1524107, rs2069835, rs2069837, rs2069838, rs2069840, rs2069842, rs2069843, rs2069845 e rs2069849. Os tag SNPs dos pacientes foram genotipados pela técnica de PCR em tempo real (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System), com o uso de TaqMan™ Genotyping Master Mix technology (Applied Biosystems).⁴²

Análise estatística

A versão SPSS 20.0 foi usada para as análises estatísticas e o software Haploview 4.2 foi utilizado para estimar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste t-Student ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi usado para variáveis quantitativas. Variáveis categóricas foram analisadas pelo teste qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Para a análise multivariada, o modelo de regressão logística binária foi ajustado para analisar as frequências genotípicas, incluindo variáveis com significância de $p < 0,20$.

Resultados

Parâmetros clínicos

As variáveis: idade, sexo, raça, tabagismo, frequência de visitas ao dentista, escovação e uso do fio dental não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Diferenças na distribuição dos seguintes parâmetros foram estatisticamente significativas entre casos e controles: número de dentes, PS, NIC, IG e IP. No entanto, para a análise multivariada não foram incluídos os parâmetros PS e NIC, por serem estes os definidores do fenótipo e o número de dentes por ser consequência da doença. Não tendo sido, portanto, essas três variáveis consideradas fatores de risco. Do mesmo modo o índice gengival não foi incluído por estar diretamente relacionado com a variável placa (IP).

Análise genética

As frequências genótípicas de todos os marcadores testados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo controle. A distribuição das frequências genótípicas para os polimorfismos estudados está apresentada na tabela 3.

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa na distribuição das frequências do marcador rs2069837 (localizado no segundo íntron do *IL6*) entre casos e controles. O alelo G do tag SNP rs2069837 no modelo dominante foi associado com a proteção à periodontite crônica ($p=0,039$). Após a análise multivariada, na presença dos parâmetros: frequência de visitas ao dentista, uso de fio dental e IP, a associação do marcador rs2069837 com a periodontite crônica foi mantida (modelo dom G: $p=0,053$).

Em relação ao marcador rs2069845, somente após a análise multivariada, houve uma associação *borderline* com a periodontite crônica ($p=0,072$).

A análise de DL confirmou independência entre todos os marcadores, com a exceção de rs2069843 e rs2069849 ($r^2=0,88$; Fig. 1).

Discussão

A periodontite tem sido classicamente definida como uma doença bucal relacionada à placa bacteriana. No entanto, é também notória a observação clínica de que não há uma clara relação entre o índice de placa (IP) e a severidade da periodontite. Por exemplo, não é incomum a ausência de periodontite em indivíduos com IP elevado; simetricamente, sua forma agressiva é totalmente compatível com baixo índice de placa. Neste contexto, a hipótese de que fatores de risco genéticos do hospedeiro, incluindo principalmente os genes das citocinas - que desempenham um papel importante no controle da suscetibilidade à periodontite - tem sido intensivamente investigada.⁴³

Como esperado, neste estudo o IP é mais elevado entre casos quando comparado com os controles. No entanto, 54,7% dos controles apresentaram IP clinicamente visível, sugerindo que esta condição não é suficiente para explicar totalmente a periodontite. O índice de placa usado no presente estudo é puramente clínico, onde a avaliação foi realizada pela quantidade de placa

observada visualmente. É, por conseguinte, uma medida quantitativa, devendo-se, portanto, ter parcimônia ao examiná-la. Uma análise qualitativa, idealmente, tornaria possível avaliar com precisão a presença ou ausência de periodontopatógenos, tanto no grupo doença como no controle.

Na análise do desequilíbrio de ligação, os tag SNPs rs2069843 e rs2069849 estão em alto DL ($r^2=88\%$), o que torna desnecessária para a população estudada a genotipagem dos dois marcadores, para o mapeamento completo do gene *IL6*. Esta informação pode ser importante no sentido de se economizar trabalho, tempo e custo para a cobertura total do gene *IL6* em futuros estudos de investigação de outras doenças em populações do sul do Brasil.

Neste estudo, foi sugerida uma evidência de associação do marcador rs2069837 (íntron 2 do gene *IL6*) no modelo dominante com proteção à periodontite crônica.

Um estudo prévio relatou evidência de associação entre uma única variante genética (-174), na região promotora do *IL6*, e a severidade à periodontite em uma amostra populacional brasileira.²⁴ Uma série de trabalhos de replicação foram realizados em diversos países que, combinados, apresentaram um cenário inconclusivo, talvez devido a uma definição inconsistente do fenótipo, diferentes estratégias para a seleção de marcadores, limitações populacionais, diferentes etnias, entre outros. Digno de nota, todos os estudos anteriores focaram em polimorfismos do gene *IL6* localizados na região reguladora do gene (promotora), deixando todo o remanescente do locus genético inexplorado. Além disso, um gene pode ter vários locais polimórficos que atuam em sinergia, de modo que o estudo de um único polimorfismo, ou mesmo de uma única região do gene, apenas proporcionará uma visão parcial do efeito das variações genéticas deste gene.⁴⁴ Considerando esta questão, este estudo aplicou uma abordagem diferente: o mapeamento físico completo do gene *IL6* obtido pela genotipagem de vários marcadores tag SNPs, que capturam toda a informação do locus gênico (Fig. 1). Usando-se este desenho, uma associação positiva, se verdadeira, poderia ser devida ao efeito da própria variante genotipada (causal) ou, mais provavelmente, que o tag SNP associado esteja ligado ao causal, fenômeno conhecido como desequilíbrio de ligação. Este pode ser o caso dos nossos

achados. O marcador rs2069837, associado com a periodontite crônica em nossa amostra populacional, está localizado no íntron 2 do gene *IL6*, sugerindo a existência de variantes localizadas *downstream* da região 5' reguladora, com impacto sobre a suscetibilidade à periodontite. Aumentar o tamanho da amostra torna-se mandatório para confirmar estas observações. Além disso, a associação *borderline* do rs2069845 pode reforçar a evidência de mais de um polimorfismo no mesmo gene atuar sinergisticamente para predispor indivíduos a doenças complexas.

A interpretação dos nossos resultados, no entanto, deve ser tratada com parcimônia, por lidarmos com uma doença complexa, multifatorial e certamente poligênica, em que uma forte interferência do ambiente e uma rigorosa modulação genética podem coexistir. Na realidade, nem sempre é possível estabelecer uma relação direta entre genótipo e fenótipo, devido à influência de diferentes fatores, como hábitos de higiene, variação da expressão gênica, penetrância alélica, entre outros. Além disso, nosso estudo tem limitações. Nossa amostra populacional é pequena – é importante mencionar, no entanto, que um reduzido tamanho da amostra tenderia mais provavelmente a um viés de falsos negativos e não de falsos positivos de associação. Portanto, tal como para todos os estudos epidemiológicos de associação genética, a replicação destes resultados em amostras populacionais independentes torna-se obrigatória.

Os SNPs parecem ser os responsáveis pela maior parte da variabilidade genética humana, resultando em uma grande diversidade de respostas a fatores externos, tais como agressão bacteriana e terapia medicamentosa. Dessa forma, o aprofundamento do conhecimento acerca da complexa interação da genética com os diversos aspectos do ambiente, permitirá, no futuro, prever com maior precisão a suscetibilidade a doenças e, conseqüentemente, obter prognósticos mais precisos e positivos. Além disso, a compreensão da etiopatogenia de doenças crônicas complexas depende fortemente da compreensão da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro.

Conclusão

Realizando-se um mapeamento físico completo do gene *IL6* (utilizando tag SNPs) evidenciou-se o alelo G (modelo dominante) do polimorfismo rs2069837 (localizado no segundo íntron do gene *IL6*), como um marcador sugestivo de proteção à periodontite crônica em uma população sul brasileira.

Referências

- [1] Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1999 Dec;4(1):1-6.
- [2] Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1585-91.
- [3] Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *Journal of periodontology*. 1992 Apr;63(4 Suppl):338-55.
- [4] Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of clinical periodontology*. 2011 Mar;38 Suppl 11:60-84.
- [5] Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000*. 1997 Jun;14:112-43.
- [6] Papanicolaou DA, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Annals of Internal Medicine*. 1998;128:127-37.
- [7] Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T, et al. B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1988 Mar 1;167(3):1253-8.
- [8] Kishimoto T, Hirano T. Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annual review of immunology*. 1988;6:485-512.
- [9] Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annual review of immunology*. 2005;23:1-21.
- [10] Park JY, Pillinger MH. Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases*. 2007;65 Suppl 1:S4-10.
- [11] Koliadenko VH, Chernyshov PV. Interleukin-6 as a marker of the activity of a pathological process in patients with psoriasis. *Likars'ka sprava / Ministerstvo okhorony zdorov'ia Ukrainy*. 2005 Jul-Sep(5-6):80-2.
- [12] Irwin CR, Myrillas TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral diseases*. 1998 Mar;4(1):43-7.
- [13] Fujihashi K, Kono Y, Beagley KW, Yamamoto M, McGhee JR, Mestecky J, et al. Cytokines and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. *Journal of periodontology*. 1993 May;64(5 Suppl):400-6.

- [14] Guillot JL, Pollock SM, Johnson RB. Gingival interleukin-6 concentration following phase I therapy. *Journal of periodontology*. 1995 Aug;66(8):667-72.
- [15] Goncalves TO, Costa D, Brodskyn CI, Duarte PM, Cesar Neto JB, Nogueira-Filho G. Release of cytokines by stimulated peripheral blood mononuclear cells in chronic periodontitis. *Archives of oral biology*. 2010 Dec;55(12):975-80.
- [16] Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *Journal of periodontology*. 1993 Oct;64(10):980-3.
- [17] Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, Takigawa M, Myoukai F, Kurihara H, et al. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontology*. 1994 Feb;65(2):147-53.
- [18] Sun XJ, Meng HX, Shi D, Xu L, Zhang L, Chen ZB, et al. Elevation of C-reactive protein and interleukin-6 in plasma of patients with aggressive periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2009 Jun;44(3):311-6.
- [19] D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *Journal of dental research*. 2004 Feb;83(2):156-60.
- [20] Prabhu A, Michalowicz BS, Mathur A. Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis. *Journal of periodontology*. 1996 May;67(5):515-22.
- [21] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 1998 Oct 1;102(7):1369-76.
- [22] Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, et al. Periodontal findings in adult twins. *Journal of periodontology*. 1991 May;62(5):293-9.
- [23] Nibali L, D'Aiuto F, Donos N, Griffiths GS, Parkar M, Tonetti MS, et al. Association between periodontitis and common variants in the promoter of the interleukin-6 gene. *Cytokine*. 2009 Jan;45(1):50-4.
- [24] Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, Jr., de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *Journal of clinical periodontology*. 2003 May;30(5):438-42.
- [25] Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi SA, Costa JE, Gomes RS, et al. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with

severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clinical and experimental immunology*. 2007 Apr;148(1):119-26.

[26] Costa AM, Guimaraes MC, de Souza ER, Nobrega OT, Bezerra AC. Interleukin-6 (G-174C) and tumour necrosis factor-alpha (G-308A) gene polymorphisms in geriatric patients with chronic periodontitis. *Gerodontology*. 2008 Mar;27(1):70-5.

[27] Franch-Chillida F, Nibali L, Madden I, Donos N, Brett P. Association between interleukin-6 polymorphisms and periodontitis in Indian non-smokers. *Journal of clinical periodontology*. 2010 Feb;37(2):137-44.

[28] Kalburgi NB, Bhatia A, Bilichodmath S, Patil SR, Mangalekar SB, Bhat K. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Indian patients with chronic periodontitis. *Journal of oral science*. 2010;52(3):431-7.

[29] Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F, et al. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *Journal of dental research*. 2005 Dec;84(12):1149-53.

[30] Holla LI, Fassmann A, Stejskalova A, Znojil V, Vanek J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2004 Jan;75(1):30-6.

[31] Komatsu Y, Tai H, Galicia JC, Shimada Y, Endo M, Akazawa K, et al. Interleukin-6 (IL-6)--373 A9T11 allele is associated with reduced susceptibility to chronic periodontitis in Japanese subjects and decreased serum IL-6 level. *Tissue antigens*. 2005 Jan;65(1):110-4.

[32] Wohlfahrt JC, Wu T, Hodges JS, Hinrichs JE, Michalowicz BS. No association between selected candidate gene polymorphisms and severe chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2006 Mar;77(3):426-36.

[33] Tervonen T, Raunio T, Knuutila M, Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 2007 May;34(5):377-83.

[34] Babel N, Cherepnev G, Babel D, Tropmann A, Hammer M, Volk HD, et al. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2006 Dec;77(12):1978-83.

[35] Jingjin L, Zemin G, Xin M, Donghong W, Jianhua G, Jie Y, et al. Correlation between an interleukin-6 -572C/G polymorphism and chronic periodontitis. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2009 Jun;30(3):301-5.

[36] Loe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *Journal of periodontology*. 1967 Nov-Dec;38(6):Suppl:610-6.

- [37] Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontologica Scandinavica*. 1964 Feb;22:121-35.
- [38] Greene JC, Vermillion JR. The Simplified Oral Hygiene Index. *Journal of the American Dental Association* (1939). 1964 Jan;68:7-13.
- [39] Trevisatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *The Journal of Forensic Odontostomatology*. 2000 Jun;18(1):6-9.
- [40] Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Brazilian Dental Journal*. 2007;18(2):148-52.
- [41] Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD. The International HapMap Project Web site. *Genome Research*. 2005 Nov;15(11):1592-3.
- [42] Lee HJ, Kim SY, Kim GS, Hwang JY, Kim YJ, Jeong B, et al. Fracture, bone mineral density, and the effects of calcitonin receptor gene in postmenopausal Koreans. *Osteoporos Int*. Aug;21(8):1351-60.
- [43] Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008 Sep;35(9):754-67.
- [44] Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000 Jun 16;275(24):18138-44.

Tabela 1. Características clínico-demográficas da população.

Variável	Grupo Caso (n=56)	Grupo Controle (n=53)	p	OR (IC 95%)
Idade	#41,64 ± 8,60*	41,23 ± 8,49	0,800 ^a	-
Sexo				
Masc	^u 19 (33,9) [§]	12 (22,6)	0,210 ^b	1,75 (0,75 – 4,10)
Fem	37 (66,1)	41 (77,4)		
Raça				
Branco	44 (78,6)	42 (79,2)	1 ^b	0,96 (0,38 – 2,41)
Mulato/Negro	12 (21,4)	11 (20,8)		
Tabagismo				
Sim	3 (5,4)	5 (9,4)	0,48 ^b	0,54 (0,12 – 2,40)
Não	53 (94,6)	48 (90,6)		
Freq. visita dentista				
Trimestral	5 (8,9)	0 (0)	0,077 ^c	
Semestral	5 (8,9)	4 (7,6)		
Anual/rara	46 (82,1)	49 (92,4)		
Escovação diária ≥ 3 vezes				
Sim	41 (73,2)	37 (69,8)	0,832 ^b	1,18 (0,51 – 2,72)
Não	15 (26,8)	16 (30,2)		
Fio dental				
Sim	32 (57,1)	40 (75,5)	0,068 ^b	2,31 (1,02 – 5,24)
Não	24 (42,9)	13 (24,5)		

DP: Desvio Padrão; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança;

Média; * Desvio Padrão; ^u Frequência; [§] Porcentagem

(a) Teste t de Student ; (b) Teste exato de Fisher; (c) Teste qui-quadrado

Tabela 2. Condições periodontais da população.

Variáveis	Grupo Caso (n=56)	Grupo Controle (n=53)	p	OR (IC 95%)
Número de dentes	[#] 25,05 ± 4,30*	26,66 ± 3,30	0,030 ^a	-
PS	2,02 ± 0,51	1,53 ± 0,06	<0,001 ^b	-
NIC	2,34 ± 0,90	1,54 ± 0,08	<0,001 ^b	-
IG				
≥ 2	^μ 25 (44,6) [§]	1 (1,9)		
< 2	31 (55,4)	52 (98,1)	<0,001 ^c	-
IP				
Não visível (PI=0)	10 (17,9)	24 (45,3)		
Visível (PI>0)	46 (82,1)	29 (54,7)	0,003 ^c	3,81 (1,59 – 9,10)

PS: Profundidade de Sondagem; **NIC:** Nível de Inserção Clínica; **IG:** Índice Gengival; **IP:** Índice de Placa; **DP:** Desvio Padrão; **OR:** Odds Ratio; **IC:** Intervalo de Confiança

[#] Média; * Desvio Padrão; ^μ Frequência; [§] Porcentagem

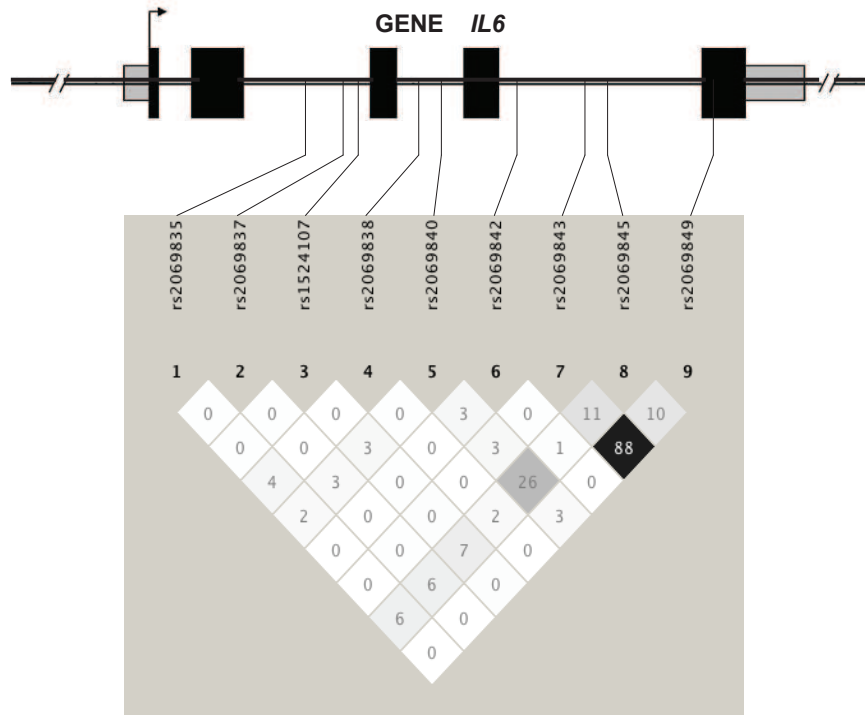
(a) Não paramétrico – teste de Mann-Whitney; (b) Teste t de Student; (c) Teste exato de Fisher

Tabela 3. Análise genotípica dos nove tag SNPs.

				p^*	OR (IC 95%)
rs1524107 Dom T	Caso	CT/TT	CC	0,168	2,05 (0,73 – 5,75)
	Controle	7 (12,5)	49 (87,5)		
rs2069835 Dom T	Caso	CT/TT	CC	0,130	0,42 (0,13 – 1,31)
	Controle	11 (20)	44 (80)		
rs2069837 Dom G	Caso	AA	AG/GG	0,039	0,28 (0,08 – 0,95)
	Controle	5 (9,4)	48 (90,6)		
rs2069838 Dom T	Caso	CC	CT/TT	1	---
	Controle	54 (96,4)	2 (3,6)		
rs2069840 Dom G	Caso	CC	CG/GG	0,645	0,84 (0,39 – 1,81)
	Controle	51 (96,2)	2 (3,8)		
rs2069842 Dom A	Caso	AG/AA	GG	1	---
	Controle	2 (3,6)	54 (96,4)		
rs2069843 Dom A	Caso	GG	AG/AA	0,237	1,91 (0,64 – 5,69)
	Controle	1 (1,9)	52 (98,1)		
rs2069845 Dom G	Caso	AA	AG/GG	0,413	1,40 (0,62 – 3,19)
	Controle	45 (80,4)	11 (19,6)		
rs2069849 Dom T	Caso	CC	CT/TT	0,196	2,13 (0,67 – 6,83)
	Controle	47 (88,7)	6 (11,3)		

* Teste exato de Fisher

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança



B

Figura 1. Análise de tag SNPs e análise de desequilíbrio de ligação do gene *IL6*. (A) Tag SNPs do gene *IL6*. Os exons estão indicados por caixas pretas e a região promotora e 3'-UTR estão demonstradas por caixas cinzas. A direção de transcrição está demonstrada por uma flecha. A posição e a identificação dos polimorfismos estão indicadas com linhas. (B) Representação esquemática do desequilíbrio de ligação (r^2) entre os nove tag SNPs do gene *IL6*.

ANEXO 1 - Análise genotípica completa

				<i>p</i>	OR (IC 95%)	
rs1524107 Dom T*	Caso	CT/TT	CC	0,168	2,05 (0,73 – 5,75)	
	Controle	7 (12,5)	49 (87,5)			
rs2069835 Dom T*	Caso	CT/TT	CC	0,130	0,42 (0,13 – 1,31)	
	Controle	11 (20)	44 (80)			
rs2069837 Add**	Caso	GG	AG	AA	0,037	3,51 (1,06 – 11,59)
	Controle	0 (0)	4 (7,6)	49 (92,5)		
rs2069837 Dom G*	Caso	AA	AG/GG	0,039	0,28 (0,08 – 0,95)	
	Controle	1 (1,9)	11 (20,8)			41 (77,4)
rs2069837 Dom A*	Caso	GG	AG/AA	1	---	
	Controle	49 (92,5)	4 (7,6)			
rs2069838 Add**	Caso	CC	CT	TT	1	---
	Controle	54 (96,4)	2 (3,6)	0		
rs2069840 Add**	Caso	GG	CG	CC	0,482	1,24 (0,67 – 2,29)
	Controle	51 (96,2)	2 (3,8)	0		
rs2069840 Dom C*	Caso	GG	CG/CC	0,420	1,84 (0,41 – 8,29)	
	Controle	3 (5,5)	52 (94,6)			
rs2069840 Dom G*	Caso	CC	CG/GG	0,645	0,84 (0,39 – 1,81)	
	Controle	5 (9,6)	47 (90,4)			
rs2069842 Dom A**	Caso	AG/AA	GG	1	---	
	Controle	31 (56,4)	24 (43,6)			
rs2069843 Add**	Caso	AA	AG	GG	0,192	0,51 (0,18 – 1,42)
	Controle	2 (3,6)	54 (96,4)	45 (80,4)		
rs2069843 Dom A	Caso	GG	AG/AA	0,237	1,91 (0,64 – 5,69)	
	Controle	1 (1,8)	10 (17,9)			47 (88,7)
rs2069843 Dom G	Caso	AA	AG/GG	1	---	
	Controle	0 (0)	55 (98,2)			
rs2069845 Add**	Caso	AA	AG	GG	0,172	1,45 (0,85 – 2,48)
	Controle	16 (29,1)	24 (43,6)	15 (27,3)		
rs2069845 Dom A	Caso	GG	AG/AA	0,140	0,48 (0,18 – 1,28)	
	Controle	19 (36,5)	25 (48,1)			8 (15,4)
rs2069845 Dom G	Caso	AA	AG/GG	0,413	1,40 (0,62 – 3,19)	
	Controle	15 (27,3)	40 (72,7)			
rs2069849 Add**	Caso	TT	CT	CC	0,162	0,46 (0,15 – 1,38)
	Controle	8 (15,4)	44 (84,6)	48 (90,6)		
rs2069849 Dom T*	Caso	CC	CT/TT	0,196	2,13 (0,67 – 6,83)	
	Controle	16 (29,1)	39 (70,9)			
rs2069849 Dom C*	Caso	TT	CT/CC	1	---	
	Controle	19 (36,5)	33 (63,5)			
	Caso	1 (1,8)	54 (98,2)			
	Controle	0 (0)	53 (100)			

ANEXO 2 - Análise Multivariada

Cada genótipo com $p < 0,2$ na univariada, controlando-se uso de fio dental, IP e visita ao dentista.

Para o ajuste dos modelos, as classificações da variável “visita ao CD” foram agrupadas em trimestralmente/semestralmente e anualmente/raramente.

Modelo A: rs2069837 Add

Variável	Valor de p*	OR	Lim inf 95%	Lim sup 95%
rs2069837 Add	0,053	3,63	0,97	13,61
Visita ao CD (trim/sem ou anual/raram)	0,031	0,22	0,05	0,89
Uso de fio dental	0,075	2,33	0,91	5,97
IP (visível ou não visível)	0,003	4,50	1,65	12,33

*Modelo de Regressão Logística e teste de Wald, $p < 0,05$

Modelo B: rs2069837 Dom G

Variável	Valor de p*	OR	Lim inf 95%	Lim sup 95%
rs2069837 Dom G	0,053	3,74	0,97	14,45
Visita ao CD (trim/sem ou anual/raram)	0,030	0,22	0,05	0,88
Uso de fio dental	0,069	2,36	0,92	6,05
IP (visível ou não visível)	0,003	4,46	1,63	12,20

*Modelo de Regressão Logística e teste de Wald, $p < 0,05$

Modelo C: rs2069843 Add

Variável	Valor de p*	OR	Lim inf 95%	Lim sup 95%
rs2069843 Add	0,382	0,62	0,21	1,85
Visita ao CD (trim/sem ou anual/raram)	0,028	0,22	0,05	0,87
Uso de fio dental	0,062	2,35	0,95	5,82
IP (visível ou não visível)	0,003	4,11	1,58	10,65

*Modelo de Regressão Logística e teste de Wald, $p < 0,05$

Modelo D: rs2069845 Add

Variável	Valor de p*	OR	Lim inf 95%	Lim sup 95%
rs2069845 Add	0,072	1,73	0,95	3,16
Visita ao CD (trim/sem ou anual/raram)	0,017	0,18	0,04	0,75
Uso de fio dental	0,047	2,55	1,00	6,47
IP (visível ou não visível)	0,001	5,71	2,04	15,97

*Modelo de Regressão Logística e teste de Wald, $p < 0,05$

Modelo E: rs2069845 Dom A

Variável	Valor de p*	OR	Lim inf 95%	Lim sup 95%
rs2069845 Dom A	0,153	2,14	0,74	6,13
Visita ao CD (trim/sem ou anual/raram)	0,020	0,19	0,05	0,78
Uso de fio dental	0,069	2,34	0,93	5,92
IP (visível ou não visível)	0,001	5,26	1,91	14,43

*Modelo de Regressão Logística e teste de Wald, $p < 0,05$

Modelo F: rs2069849 Add

Variável	Valor de p*	OR	Lim inf 95%	Lim sup 95%
rs2069849 Add	0,366	0,59	0,18	1,89
Visita ao CD (trim/sem ou anual/raram)	0,025	0,21	0,05	0,84
Uso de fio dental	0,073	2,28	0,92	5,67
IP (visível ou não visível)	0,005	3,89	1,50	10,12

*Modelo de Regressão Logística e teste de Wald, $p < 0,05$

Modelo G: rs2069849 Dom T

Variável	Valor de p*	OR	Lim inf 95%	Lim sup 95%
rs2069849 Dom T	0,417	0,60	0,18	2,07
Visita ao CD (trim/sem ou anual/raram)	0,025	0,21	0,05	0,84
Uso de fio dental	0,068	2,31	0,93	5,72
IP (visível ou não visível)	0,005	3,92	1,51	10,20

*Modelo de Regressão Logística e teste de Wald, $p < 0,05$

ANEXO 3

PRONTUÁRIO

*Critério de exclusão para pacientes não-renais.

**Critério de exclusão para pacientes renais e não-renais.

Nome:

CPF:

Prontuário Pró-Renal: Data:

/ / Prontuário:

Naturalidade:

Nacionalidade:

Estado Civil:

Profissão:

Endereço Residencial:

Endereço Comercial:

Telefones:

Data de Nascimento:

Idade:

Sexo: M () F ()

Raça (B/N/M):

Peso:

Altura:

História Médica

Medicamentos:

É portador de alguma dessas doenças (sim ou não)? Há quanto tempo?

*Diabetes:

*Hepatite:

**Aids:

**Sífilis:

**Febre reumática:

**Tuberculose ativa:

Asma:

* Doença renal:

Tipo:

Tempo de diálise:

Modalidade de

diálise:

**Infecções ativas (Septicemia, Peritonite, Endocardite, Endarterite, Fístula infeccionada):

Doenças respiratórias (Ouvido, Nariz, Garganta, Sinusite):

Doenças cardíacas (Prolapso de Válvula Mitral, Próteses, Catéter):

Pressão arterial:

Hipertensão:

Desmaios/Convulsões:

**Neoplasias malignas:

**Já realizou tratamento anti-neoplásico (Quimio/Radioterapia)?

**Doenças auto-imunes:

**Estado de imunossupressão:

*Antiinflamatório crônico? Qual? Há quanto tempo?

**Antibiótico nos últimos três meses? Qual?

**Corticosteróide? Qual? Há quanto tempo?

É alérgico a algum medicamento?

Fumante? Quanto tempo? Quantos cigarros por dia?

Álcool:

**Está grávida ou amamentando?

Está fazendo terapia de reposição hormonal?

Está usando pílula anticoncepcional?

Restrição alimentar:

Suplemento alimentar:

História Odontológica

Dieta cariogênica:

Hábitos parafuncionais:

Xerostomia (hipossalivação)/Ardência bucal:

Na sua última visita ao dentista o senhor lembra qual foi o motivo?

Freqüência de visitas ao dentista?

Já apresentou infecções sérias nos dentes e nas gengivas?

Suas gengivas sangram com facilidade?

Já perdeu algum dente por motivo periodontal (“dente ficou mole”)?

Já realizou algum tratamento periodontal? Qual?

Há quanto tempo tem doença periodontal?

Apresenta história familiar de doença periodontal?

****GUN/PUN:**

Presença de defeitos esmalte (fluorose, amelogênese imperfeita, etc):

Presença de fraturas, erosões, atrição, perimólise:

Freq. Escovação: <3x /dia () >3x/dia ()

Fio-Dental: sim () não ()

Uso de Flúor:

sim () não ()

ANEXO 5

ÍNDICE GENGIVAL (IG)

Grau	Condição Gengival
0	Gengiva normal (ausência de sinais de inflamação).
1	Inflamação leve, pequena alteração na cor, pouco edema; nenhum sangramento a sondagem.
2	Inflamação moderada, rubor intenso e superfície brilhante; sangramento a sondagem.
3	Inflamação grave, rubor intenso e edema, ulceração; tendência ao sangramento espontâneo.

(Löe, 1967)

ÍNDICE DE PLACA (IP)

Grau	Características
0	Ausência de depósitos de placa.
1	Visualização da placa após sua remoção com o uso da sonda periodontal na margem gengival.
2	Placa clinicamente visível.
3	Placa abundante.

(Silness & Löe, 1964)

Complete Physical Mapping of *IL6* Reveals a New Marker Associated With Chronic Periodontitis

Abstract

Chronic periodontitis (CP) is a complex infectious inflammatory disease with a strong genetic and environmental influence on its phenotype. Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine that exerts a clear regulating role in inflammatory processes in general and especially in periodontitis. In recent decades we have seen several important genetic association studies between polymorphisms of *IL6* gene and chronic periodontitis, with a special focus on its promoter region. In this study, for the first time, we perform a modern approach, targeting a complete physical mapping of the gene *IL6* in a southern Brazilian population sample. A total of 109 individuals both sexes, mean age 41.5 ± 8.5 years were divided into a case group, composed of 56 subjects with CP, and a control group of 53 individuals clinically characterized as CP free. After DNA collection and purification, nine tag SNPs were evaluated, covering the entire gene: rs1524107, rs2069835, rs2069837, rs2069838, rs2069840, rs2069842, rs2069843, rs2069845 and rs2069849, following the International HapMap Project, by real time PCR. It was found that marker rs2069837 (located in the second intron of *IL6*) under G dominant was associated with protection against chronic periodontitis in a Brazilian population in the presence of clinical variables, such as visible plaque, dentist visit frequency and dental floss use and suggested for the first time as a marker of susceptibility to CP.

Key-words: Single nucleotide polymorphism, tag SNP, chronic periodontitis, interleukin-6.

Introduction

Periodontitis is a highly prevalent, destructive inflammatory disease of the teeth supporting tissues. The condition may be classified into two broad categories, namely chronic periodontitis (CP) and aggressive periodontitis (AP) [1].

In CP, the periodontal tissue destruction is mediated by the host response induced by bacteria [2] and involves complex interactions between cells and the extracellular matrix, largely mediated by cytokines [3]. Cytokines are soluble proteins that bind to specific receptors on target cells, triggering intra-cellular cascades, possibly resulting in phenotypic changes [4]. They regulate the amplitude and duration of the host immune-inflammatory response [5].

Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional cytokine with a broad range of humoral and cellular immune effects on inflammatory reactions, thus constituting a primordial mediator of the host response to injury and infection [6]. IL-6 is involved in T cell proliferation [7] and in differentiation of activated B cells into high rate immunoglobulin (Ig)-secreting plasma cells [8]. Many clinical situations increase the production of IL-6 in tissue injury, malignant conditions, infections, immune hypersensitivity reactions and autoimmune diseases [6, 9] such as atherosclerosis [45], rheumatoid arthritis [10], and psoriasis [11].

IL-6 is a powerful stimulator of osteoclast differentiation and bone resorption [12]. Excessive amounts of IL-6 are produced locally in patients with chronic periodontitis, being expressed by many cells in the periodontal lesion, suggesting an immunopathologic role in the development of abnormal immune responses and tissue destruction in periodontal disease [13, 14]. Experimental data suggests that peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated by lipopolysaccharide induce a different pattern of IL-6 release in subjects with periodontitis when compared to PBMC from healthy subjects [15].

Recognizing its important role in inflammatory diseases, IL-6 has been considered a useful indicator or a diagnostic marker for periodontal disease [16]. It is present at higher levels in inflamed tissue [17], gingival crevicular fluid, and plasma of periodontitis patients [18]. However, a significant reduction of its serum level has been observed after periodontal therapy [19]. In periodontitis patients higher expression of *IL6* mRNA was reported in diseased than in healthy tissues [20].

Increased susceptibility to inflammatory tissue damage has been linked to the individual faculty to produce higher levels of IL-6. This pattern of response to environmental stimuli has been suggested to be genetically determined and may predispose to chronic inflammatory disorders as demonstrated by Fishman et al. (1998) [21]. Strong evidences indicate that the risk of developing periodontitis, as well as the age of onset and severity are affected by genetic and environmental factors [22]. Such individual variability seems to be regulated by common nucleotide variations in the *IL6* gene located on the short arm of chromosome 7 [21, 23].

In 2003, a pioneer study revealed the first evidence of association between *IL6* (G-174C) polymorphism and susceptibility to severe chronic periodontitis in a Brazilian population, suggesting a protective effect for allele C [24]. This early result triggered several following studies aimed to investigate the role of *IL6* variants in periodontal diseases. Specifically, the *IL6* (-174) polymorphism has been extensively evaluated both in CP and AP, however, with conflicting results: while positive evidence for association has been detected in Brazilian [25, 26], Indian [27, 28] and British [23, 29] population samples, studies performed in Czech [30], Japanese [31], North American [32] and Finns [33] samples failed to detect the same effect. A study with a German population found positive evidence for association between *IL6* (-174) and periodontitis, however, with the CC genotype associated with CP [34], while in the abovementioned Brazilian population, the C allele was associated with protection against, instead of susceptibility to CP [24]. Even when additional SNP markers of the *IL6* promoter are investigated, the scenario is still inconclusive: a study with a Czech population sample revealed that *IL6* -572 heterozygous GC was enriched among controls when compared with cases of CP, although no evidence for association was detected between the disease and alleles of *IL6* -597 [30]. This same SNP (*IL6* -572) was associated with CP in a Chinese study, but now in its homozygous form (GG genotype) [35]. In contrast, in a large study on a population sample from London, subdivided in Caucasians, Blacks, and Asians, encompassing CP and AP, markers -174 and -1363 were associated with periodontitis only in Caucasians, while -572 was not associated with disease in any ethnic group. In the same study, -1480 and -6106 SNPs were associated with localized aggressive periodontitis [23].

Taken together, these results seem to implicate *IL6* genetic variants in the control of susceptibility to periodontitis – however, the exact nature of this genetic effect is still widely unknown. Important, all of these previous works focused on functional polymorphisms located at the promoter region of the *IL6* gene. Therefore, a more comprehensive strategy, involving the whole gene, is yet to be performed. Here we present the results of the first association study between chronic periodontitis and *IL6* based on the complete physical coverage of the gene locus, using tag SNPs, that capture the entire variation information of the gene, in an unbiased positional approach, using a population sample from the south of Brazil.

Methods

Study population

This study was approved by an Institutional Ethics Review Board. All volunteers signed a consent form after being advised of the nature of the study (approved by the Ethical Committee in Research at PUCPR - protocol 264/10184). A sample of 109 southern Brazilian individuals of both sexes, mean age 41.5 ± 8.5 years, was selected from the dental clinics of Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR), divided into a case group, composed by 56 subjects with CP and a control group of 53 individuals clinically characterized as CP free. Diagnosis of CP was made on the basis of clinical parameters PPD (probing pocket depth) and assessment CAL (clinical attachment loss), both recorded at 4 points around each tooth. Subjects with $CAL \geq 5$ mm, in at least 3 teeth, in at least 2 quadrants, were considered affected. Control group was composed of subjects found to exhibit no signs of periodontitis as determined by the absence of clinical attachment loss and no sites with $PPD > 3$ mm [1]. The baseline clinical parameters for the subject population are presented in Table 1. Patients were not included if presented chronic use of anti-inflammatory drugs, history of diabetes, hepatitis or HIV infection, immunosuppressive chemotherapy, systemic active infection, current pregnancy or lactation, diseases of the oral hard or soft tissues (except caries and periodontal disease), use of orthodontic appliances and presence of necrotizing periodontal diseases.

Clinical parameters

Subjects completed personal, medical and dental history questionnaires, self reporting sex, age, ethnicity, smoking, brushing frequency, use of dental floss, and frequency of dental visits (Table 1). Clinical examination provided information on number of teeth, probing pocket depth (PPD), clinical attachment loss (CAL), gingival index (GI) [37], plaque index (PI) [38], calculus index (CI) [46], and tooth mobility. Periodontal status of the study population is summarized in Table 2.

DNA collection

Enrolled individuals were asked to mouthwash for one minute with a 3 % glucose solution. Following mouthwash, a sterile wood spatula was used to scrape oral mucosa [39]. The tip of the spatula was then shaken into the retained mouthwash solution. Buccal epithelial cells were pelleted by centrifugation at 2000 rpm for 10 min. The supernatant was discarded and the cell pellet resuspended in 1.300 ml of extraction buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM EDTA, 0.5% SDS]. Ten μ l proteinase K (20 mg/ml) were added to the solution, being left overnight at 65°C. DNA was purified by adding ammonium acetate 10 M, precipitated with isopropanol and resuspended with 50 μ l Tris 10 mM (pH 7.6) and EDTA 1 mM [40].

Marker selection and genotyping

Tag SNPs markers capturing the entire information of the IL6 locus were selected according to the information available at the International HapMap Project Web site [41], release 24/phase 2_Nov08 (Hapmap.org, 2009). All selected markers presented a minor allele frequency of 0.05 or higher in the YRI (African) HapMap population. A cut off of $r^2 \geq 0.8$ the YRI population was considered to define linkage disequilibrium (LD). After applying the above criteria, 9 tag SNPs capturing the entire information of the IL6 locus were selected for genotyping: rs1524107, rs2069835, rs2069837, rs2069838, rs2069840, rs2069842, rs2069843, rs2069845 and rs2069849. Patients were genotyped for the tag SNPs by the technique of real-time PCR (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System) with the use of TaqMan™ Genotyping Master Mix technology (Applied Biosystems) [42].

Statistical Analysis

SPSS version 20.0 was used for statistical analyses and software Haploview 4.2 was used to estimate the Hardy-Weinberg equilibrium. Student's t-test or nonparametric Mann-Whitney test was used for testing of quantitative variables. Categorical variables were analyzed using Pearson's chi-square or Fisher's exact test. Statistical significance was accepted for p values < 0.05 . For the multivariate analysis, Binary Logistic Regression model was adjusted to analyze genotypic frequencies, including variables with $p < 0.20$ significance in the bivariate tests as co-variables.

Results

Clinical findings

The demographic and clinical parameters age, gender, ethnicity, smoking, dental visit frequency, brushing and dental floss use did not show significant differences between groups. Differences in the distribution of the following parameters were statistically significant between cases and controls: number of teeth ($p=0.030$), PPD ($p<0.001$), CAL ($p<0.001$), GI ($p<0.001$), PI ($p=0.003$), CI ($p<0.001$), and dental mobility ($p<0.001$). However, for the multivariate analysis we did not include PPD and CAL because they defined the phenotype and the variables number of teeth and mobility to be a consequence of disease could not be considered risk factors. Similarly, gingival and calculus indexes were not included because they are directly related to the variable plaque.

Genetic analysis

Genotypic and allelic frequencies of all markers tested were in Hardy Weinberg equilibrium in the control sample. The distribution of genotypic frequencies for the polymorphisms studied in cases and controls is shown in Table 3.

It was observed statistically significant difference in the distribution of genotypic frequencies of marker rs2069837 (located in *IL6* second intron) between cases and controls under dominant model ($p=0.039$), allele G protecting against chronic periodontitis. A multivariate analysis was conducted, using logistic regression adjustment for this marker in the presence of the following parameters: dental visit frequency, dental floss use, and PI and the

significant association of this marker with protection against CP was maintained (dom G: $p=0.053$).

In relation to marker rs2069845, only after the multivariate analysis there was a borderline association ($p=0.072$).

Linkage disequilibrium analysis confirmed independence between all markers, with the exception of rs2069843 and rs2069849 ($r^2=0.88$; Fig. 1).

Discussion

Periodontitis has been classically defined as a plaque-related oral disease. However, it is also classic the clinical observation that there is no clear proportional relationship between plaque index (PI) and periodontitis severity. For example, it is not uncommon the absence of periodontitis in individuals with high PI; symmetrically, its aggressive form is fully compatible with low plaque index. In this context, the hypothesis that host genetic risk factors – mainly cytokine genes [43] – play a major role in the control of susceptibility to periodontitis has been intensively investigated.

As expected, in this study PI is higher among cases when compared to controls. However, 54.7% of the controls present clinically visible PI, suggesting that this condition is not sufficient to explain periodontitis. The plaque index evaluation used in this study is purely clinical, where the assessment was made by the amount of plaque visually observed. It is therefore, a quantitative measure, which brings serious limitations. We must, therefore, look with caution at it. The qualitative analysis should further make possible to assess accurately the presence or absence of specific periodontopathogens in both disease and control groups. Noteworthy, several studies of Nibali et al. [47-50] defend the hypothesis that IL-6 higher producers could be prone to the growth of periodontopathogens such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), which could benefit from the hyper-activation of host cells using inflammatory products for their survival and replication [49]. In their recent work [50], *IL6* -174 G homozygosity showed a strong association with the presence of Aa.

Here, we present evidence for statistically significant association of marker rs2069837 (intron 2 of the *IL6* gene) under dominant model with protection against chronic periodontitis and even after the multivariate analysis.

A previous study detected the first evidence for association between a single genetic variant (-174) in the promoter region of *IL6* and the severity of periodontitis in a Brazilian population sample [24]. This early finding triggered a series of replication papers that combined today present us with an inconclusive scenario, perhaps due to inconsistent phenotype definition, different strategies for marker selection, among others. Of note, all of the previous studies focused on *IL6* polymorphisms located at the regulatory region of the gene, leaving the entire remaining gene locus unexplored. Furthermore, a gene may have multiple polymorphic sites that act in synergy, so the study of a single polymorphism or even a single region of the gene will only give a partial view of the effect of genetic variations of this gene [44]. To address this question, our study applied a different approach: complete physical mapping of *IL6*, achieved by genotyping several markers (tag SNPs) that capture the entire information of the gene locus (Fig. 1). Using this design, positive association, if true, may be due to the effect of the genotyped variant itself (causal) or, more likely, that the associated tag SNP is itself linked with the causal one, a phenomenon known as linkage disequilibrium. This may be the case of our findings. Marker rs2069837 associated with protection against periodontitis in our population sample is located at intron 2 of *IL6*, suggesting the existence of *IL6* variants located downstream of the 5' regulatory region with impact over periodontitis susceptibility. Increasing the sample size is mandatory to confirm these observations. Moreover, the borderline association of rs2069845 may reinforce the evidence of more than one polymorphism in the same gene acting synergistically to predispose individuals to complex conditions.

The interpretation of our findings, nevertheless, must be treated with parsimony as we deal with a complex, multifactorial and certainly polygenic disease, in which a strong interference of environment as well as gene interactions may exist. Indeed, it is not always possible to establish a direct relationship between genotype and phenotype due to different factors influence such as hygiene habits, variation in gene expression and allele penetration, among others. Moreover, our study has limitations. Our population sample is small – important, however, a small sample size would most likely bias the investigation towards false negative, and not false positive signals of association. Therefore, as for every genetic epidemiology study of association

today, replication of the findings in independent population samples is mandatory.

SNPs seem to be responsible for most of human genetic variability, resulting in a great diversity of responses to external factors such as bacterial aggression or drug therapy. Then, the deepening of our knowledge in this complex interaction of genetics with several aspects of the environment will enable us in the future to more accurately predict susceptibility of diseases and hence obtain more precise and positive prognosis. Furthermore, the comprehension of chronic complex diseases etiopathogenesis strongly depends on the understanding of the host immune inflammatory response background.

Conclusion

A complete physical mapping of *IL6* (using tag SNPs) was carried out for the first time unveiling polymorphism rs2069837 (located in *IL6* second intron) as a suggestive marker of protection against chronic periodontitis in a Brazilian population.

References

- [1] Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1999 Dec;4(1):1-6.
- [2] Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1585-91.
- [3] Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *Journal of periodontology*. 1992 Apr;63(4 Suppl):338-55.
- [4] Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of clinical periodontology*. 2011 Mar;38 Suppl 11:60-84.
- [5] Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000*. 1997 Jun;14:112-43.
- [6] Papanicolaou DA, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Annals of Internal Medicine*. 1998;128:127-37.
- [7] Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T, et al. B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1988 Mar 1;167(3):1253-8.
- [8] Kishimoto T, Hirano T. Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annual review of immunology*. 1988;6:485-512.
- [9] Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annual review of immunology*. 2005;23:1-21.
- [10] Park JY, Pillinger MH. Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases*. 2007;65 Suppl 1:S4-10.
- [11] Koliadenko VH, Chernyshov PV. Interleukin-6 as a marker of the activity of a pathological process in patients with psoriasis. *Likars'ka sprava / Ministerstvo okhorony zdorov'ia Ukrainy*. 2005 Jul-Sep(5-6):80-2.
- [12] Irwin CR, Myrillas TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral diseases*. 1998 Mar;4(1):43-7.
- [13] Fujihashi K, Kono Y, Beagley KW, Yamamoto M, McGhee JR, Mestecky J, et al. Cytokines and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. *Journal of periodontology*. 1993 May;64(5 Suppl):400-6.
- [14] Guillot JL, Pollock SM, Johnson RB. Gingival interleukin-6 concentration following phase I therapy. *Journal of periodontology*. 1995 Aug;66(8):667-72.
- [15] Goncalves TO, Costa D, Brodskyn CI, Duarte PM, Cesar Neto JB, Nogueira-Filho G. Release of cytokines by stimulated peripheral blood mononuclear cells in chronic periodontitis. *Archives of oral biology*. 2010 Dec;55(12):975-80.
- [16] Geivellis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *Journal of periodontology*. 1993 Oct;64(10):980-3.
- [17] Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, Takigawa M, Myoukai F, Kurihara H, et al. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontology*. 1994 Feb;65(2):147-53.
- [18] Sun XJ, Meng HX, Shi D, Xu L, Zhang L, Chen ZB, et al. Elevation of C-reactive protein and interleukin-6 in plasma of patients with aggressive periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2009 Jun;44(3):311-6.
- [19] D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with

- a reduction in serum inflammatory markers. *Journal of dental research*. 2004 Feb;83(2):156-60.
- [20] Prabhu A, Michalowicz BS, Mathur A. Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis. *Journal of periodontology*. 1996 May;67(5):515-22.
- [21] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 1998 Oct 1;102(7):1369-76.
- [22] Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, et al. Periodontal findings in adult twins. *Journal of periodontology*. 1991 May;62(5):293-9.
- [23] Nibali L, D'Aiuto F, Donos N, Griffiths GS, Parkar M, Tonetti MS, et al. Association between periodontitis and common variants in the promoter of the interleukin-6 gene. *Cytokine*. 2009 Jan;45(1):50-4.
- [24] Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, Jr., de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *Journal of clinical periodontology*. 2003 May;30(5):438-42.
- [25] Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi SA, Costa JE, Gomes RS, et al. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clinical and experimental immunology*. 2007 Apr;148(1):119-26.
- [26] Costa AM, Guimaraes MC, de Souza ER, Nobrega OT, Bezerra AC. Interleukin-6 (G-174C) and tumour necrosis factor-alpha (G-308A) gene polymorphisms in geriatric patients with chronic periodontitis. *Gerodontology*. 2008 Mar;27(1):70-5.
- [27] Franch-Chillida F, Nibali L, Madden I, Donos N, Brett P. Association between interleukin-6 polymorphisms and periodontitis in Indian non-smokers. *Journal of clinical periodontology*. 2010 Feb;37(2):137-44.
- [28] Kalburgi NB, Bhatia A, Bilichodmath S, Patil SR, Mangalekar SB, Bhat K. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Indian patients with chronic periodontitis. *Journal of oral science*. 2010;52(3):431-7.
- [29] Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F, et al. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *Journal of dental research*. 2005 Dec;84(12):1149-53.
- [30] Holla LI, Fassmann A, Stejskalova A, Znojil V, Vanek J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2004 Jan;75(1):30-6.
- [31] Komatsu Y, Tai H, Galicia JC, Shimada Y, Endo M, Akazawa K, et al. Interleukin-6 (IL-6)--373 A9T11 allele is associated with reduced susceptibility to chronic periodontitis in Japanese subjects and decreased serum IL-6 level. *Tissue antigens*. 2005 Jan;65(1):110-4.
- [32] Wohlfahrt JC, Wu T, Hodges JS, Hinrichs JE, Michalowicz BS. No association between selected candidate gene polymorphisms and severe chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2006 Mar;77(3):426-36.
- [33] Tervonen T, Raunio T, Knuutila M, Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 2007 May;34(5):377-83.
- [34] Babel N, Cherepnev G, Babel D, Tropmann A, Hammer M, Volk HD, et al. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2006 Dec;77(12):1978-83.

- [35] Jingjin L, Zemin G, Xin M, Donghong W, Jianhua G, Jie Y, et al. Correlation between an interleukin-6 -572C/G polymorphism and chronic periodontitis. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2009 Jun;30(3):301-5.
- [36] Lindhe J RR, Lamster I, Charles A, Chung C-P, Flemmig T, Kinane D, Listgarten M, Løe H, Schoor R, Seymour G, Somerman M. Consensus report: chronic periodontitis. *Annals of Periodontology*. 1999;4(1).
- [37] Loe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *Journal of periodontology*. 1967 Nov-Dec;38(6):Suppl:610-6.
- [38] Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy. Ii. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta odontologica Scandinavica*. 1964 Feb;22:121-35.
- [39] Trevisatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *The Journal of forensic odonto-stomatology*. 2000 Jun;18(1):6-9.
- [40] Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Brazilian dental journal*. 2007;18(2):148-52.
- [41] Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD. The International HapMap Project Web site. *Genome research*. 2005 Nov;15(11):1592-3.
- [42] Lee HJ, Kim SY, Kim GS, Hwang JY, Kim YJ, Jeong B, et al. Fracture, bone mineral density, and the effects of calcitonin receptor gene in postmenopausal Koreans. *Osteoporos Int*. Aug;21(8):1351-60.
- [43] Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *Journal of clinical periodontology*. 2008 Sep;35(9):754-67.
- [44] Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Jun 16;275(24):18138-44.
- [45] Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clinical chemistry*. 2008 Jan;54(1):24-38.
- [46] Greene JC, Vermillion JR. The Simplified Oral Hygiene Index. *Journal of the American Dental Association* (1939). 1964 Jan;68:7-13.
- [47] Nibali L, Ready DR, Parkar M, Brett PM, Wilson M, Tonetti MS, et al. Gene polymorphisms and the prevalence of key periodontal pathogens. *Journal of dental research*. 2007 May;86(5):416-20.
- [48] Nibali L, Tonetti MS, Ready D, Parkar M, Brett PM, Donos N, et al. Interleukin-6 polymorphisms are associated with pathogenic bacteria in subjects with periodontitis. *Journal of periodontology*. 2008 Apr;79(4):677-83.
- [49] Nibali L, Donos N, Farrell S, Ready D, Pratten J, Tu Y, et al. Association Between IL6 -174 Polymorphism and *A.actinomycescomitans* in Chronic Periodontitis. *Journal of periodontology*. 2010 Aug 3.
- [50] Nibali L, Madden I, Franch Chillida F, Heitz-Mayfield L, Brett P, Donos N. IL6 -174 genotype associated with *Aggregatibacter actinomycescomitans* in Indians. *Oral diseases*. 2011 Mar;17(2):232-7.

Table 1 – Baseline characteristics of the study sample.

Variable		Study Group (n=56)	Control Group (n=53)	p-value	OR (CI 95%)
Age	Mean ± SD	41.64 ± 8.60	41.23 ± 8.49	0.800 ^a	-
Gender	Freq (%)				
	Male	19 (33.9)	12 (22.6)		
	Female	37 (66.1)	41 (77.4)	0.210 ^b	1.75 (0.75 – 4.10)
Ethnic group	Freq (%)				
	White	44 (78.6)	42 (79.2)		
	Mulatto/Black	12 (21.4)	11 (20.8)	1 ^b	0.96 (0.38 – 2.41)
Smoking habits	Freq (%)				
	Yes	3 (5.4)	5 (9.4)		
	No	53 (94.6)	48 (90.6)	0.48 ^b	0.54 (0.12 – 2.40)
Dental visit frequency	Freq (%)				
	Quarter	5 (8.9)	0 (0)		
	Semester	5 (8.9)	4 (7.6)	0.077 ^c	
	Annually/rarely	46 (82.1)	49 (92.4)		
Brushing daily ≥ 3 times	Freq (%)				
	Yes	41 (73.2)	37 (69.8)		
	No	15 (26.8)	16 (30.2)	0.832 ^b	1.18 (0.51 – 2.72)
Dental floss use	Freq (%)				
	No	24 (42.9)	13 (24.5)		
	Yes	32 (57.1)	40 (75.5)	0.068 ^b	2.31 (1.02 – 5.24)

SD: Standard Deviation; OR: Odds Ratio; CI: Confidence Interval

(a) Student t-test; (b) Fisher exact test; (c) Chi-square test

Table 2 – Periodontal status of the study sample.

Variables		Study Group (n=56)	Control Group (n=53)	p-value	OR (CI 95%)
Number of teeth	Mean ± SD	25.05 ± 4.30	26.66 ± 3.30	0.030 ^a	-
PPD	Mean ± SD	2.02 ± 0.51	1.53 ± 0.06	<0.001 ^b	-
CAL	Mean ± SD	2.34 ± 0.90	1.54 ± 0.08	<0.001 ^b	-
GI	Freq (%)				
	≥ 2	25 (44.6)	1 (1.9)		
	< 2	31 (55.4)	52 (98.1)	<0.001 ^c	-
PI	Freq (%)				
	No visible (PI=0)	10 (17.9)	24 (45.3)		
	Visible (PI>0)	46 (82.1)	29 (54.7)	0.003 ^c	3.81 (1.59 – 9.10)
CI	Freq (%)				
	> 1	15 (26.8)	0 (0)		
	≤ 1	41 (73.2)	53 (100)	<0.001 ^c	-
Mobility	Freq (%)				
	Yes	23 (41.1)	1 (1.9)		
	No	33 (58.9)	52 (98.1)	<0.001 ^c	-

PPD: Probing Pocket Depth; CAL: Clinical Attachment Loss; GI: Gingival Index; PI: Plaque Index; CI: Calculus Index; SD: Standard Deviation; Odds Ratio; CI: Confidence Interval

(a) non-parametric Mann-Whitney; (b) Student t-test; (c) Fisher exact test

Table 3. Genotypic analysis of the nine tag SNPs.

				<i>p</i> -value	OR** (CI 95%)
rs1524107 Dom T*	Study	CT/TT	CC	0.168	2.05 (0.73 – 5.75)
	Control	7 (12.5)	49 (87.5)		
rs2069835 Dom T*	Study	CT/TT	CC	0.130	0.42 (0.13 – 1.31)
	Control	12 (22.6)	41 (77.4)		
rs2069837 Dom G*	Study	AA	AG/GG	0.039	0.28 (0.08 – 0.95)
	Control	5 (9.4)	48 (90.6)		
rs2069838 DomT*	Study	CC	CT/TT	1	---
	Control	49 (92.5)	4 (7.6)		
rs2069840 Dom G*	Study	CC	CG/GG	0.645	0.84 (0.39 – 1.81)
	Control	41 (77.4)	12 (22.6)		
rs2069842 Dom A*	Study	AG/AA	GG	1	---
	Control	31 (56.4)	24 (43.6)		
rs2069843 Dom A*	Study	GG	AG/AA	0.237	1.91 (0.64 – 5.69)
	Control	27 (51.9)	25 (48.1)		
rs2069845 Dom G*	Study	AA	AG/GG	0.413	1.40 (0.62 – 3.19)
	Control	2 (3.6)	54 (96.4)		
rs2069849 Dom T*	Study	CC	CT/TT	0.196	2.13 (0.67 – 6.83)
	Control	1 (1.9)	52 (98.1)		

*Fisher exact test

**OR: Odds Ratio; CI: Confidence Interval

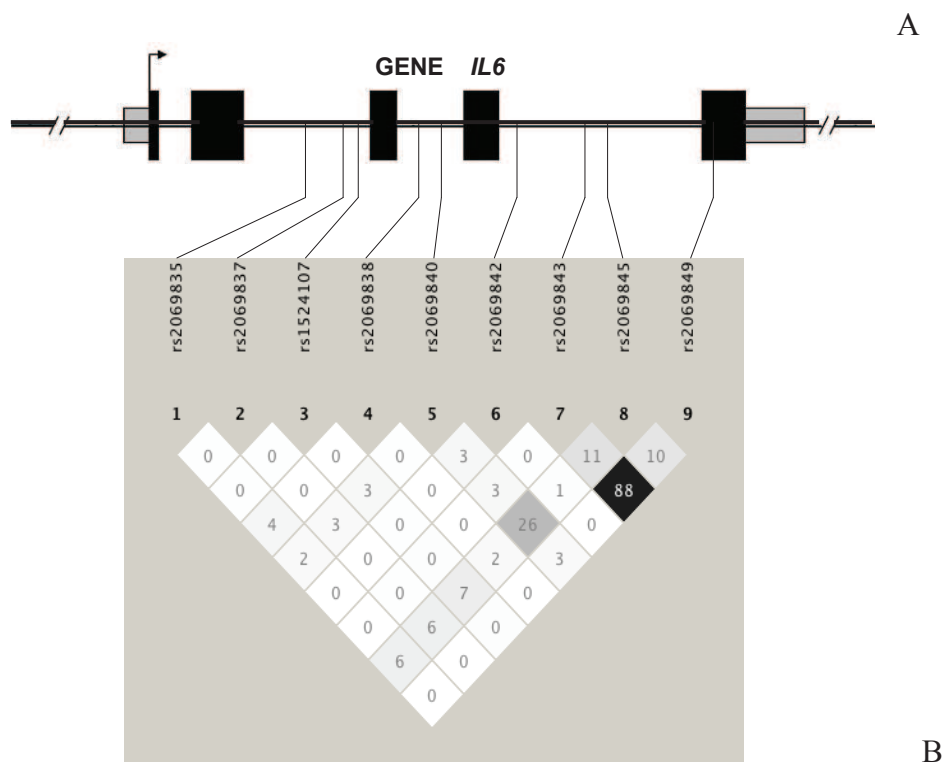


Figure 1. (A) *IL6* tag SNPs. The exons are indicated by black boxes and the promoter and 3'-UTR are denoted by smaller gray boxes. The direction of transcription is labeled with arrow. The position and identity of polymorphisms are indicated with lines. (B) Schematic representation of multimarker LD (r^2) between the nine analyzed *IL6* tag SNPs. Note that rs2069843 and rs2069849 are in high LD ($r^2=88\%$), which makes unnecessary for the population studied to genotype both for the complete mapping of *IL6* gene. This information may be valuable to save work, time and cost to cover the entire *IL6* gene in future studies investigating other diseases in southern Brazilian populations.