

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS APLICADAS À
FARMÁCIA

EMÍLIA ÂNGELA SIPPERT

Associação entre polimorfismos no gene do sistema de grupo sanguíneo Duffy e
em região reguladora de *IL8* com a periodontite crônica

Maringá
2012

EMÍLIA ÂNGELA SIPPERT

Associação entre polimorfismos no gene do sistema de grupo sanguíneo Duffy e em região reguladora de *IL8* com a periodontite crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Sell

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Jeane Eliete Laguila Visentainer

Maringá
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

EMÍLIA ÂNGELA SIPPERT

Associação entre polimorfismos no gene do sistema de grupo sanguíneo Duffy e em região reguladora de *IL8* com a periodontite crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a Dr^a Ana Maria Sell
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Lilian Maria de Castilho
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Cléverson de Oliveira e Silva
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr^a. Maryse St-Louis
Université Laval/ Canadá

Prof. Dr^a. Maria Angelica E. Watanabe
Universidade Estadual de Londrina

Data: 30 de novembro de 2012

Local de defesa: Sala05, Bloco I90. Universidade Estadual de Maringá.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S618a Sippert, Emilia Ângela
Associação entre polimorfismos no gene do sistema de grupo sanguíneo Duffy e em região reguladora de *IL8* com a periodontite crônica / Emilia Ângela Sippert. -- Maringá, 2012.
61 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Sell.
Co-orientadora: Dr^a. Jeane Eliete Laguila Visentainer.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, 2012.

1. Antígenos de grupos sanguíneos. 2. Sistema de grupo sanguíneo Duffy. 3. Interleucina-8. 4. Periodontite. 5. Estudos de associação genética. 6. Receptor de quimiocina. I. Sell, Ana Maria, orient. II. Visentainer, Jeane Eliete Laguila, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. IV. Título.

CDD 21.ed. 616.0796

AHS-001500

DEDICATÓRIA(S)

Aos meus pais Wilson (“in memoriam”) e Fátima vocês são os eternos orientadores da minha formação pessoal e profissional! Obrigada por todo amor, compreensão e incentivo, não medindo esforços em todas as etapas da minha vida! Por enxergarem muito antes este momento e por acreditarem e confiarem em mim! Amo vocês!!!

À minha orientadora, professora Ana Sell, exemplo de profissional, dedicação e esforço, sempre pronta a ouvir, ensinar e orientar. Obrigada por acreditar em mim e por todo incentivo durante esses dois anos!!

AGRADECIMENTO(S)

Agradeço a Deus, por colocar pessoas maravilhosas em minha vida como minha família maravilhosa que sempre me deu força, carinho e apoio, meus amigos e por todas as oportunidades e bênçãos que me proporciona no presente e que me faz almejar o futuro.

A minha mãe pelos seus conselhos, pelo seu apoio e palavras de coragem nos momentos que mais precisei, por confiar em mim, por se fazer presente mesmo estando a muitos quilômetros de distância. Obrigada Mãe! TE AMO!

As minhas irmãs Luciane e Fabiane que muito me incentivaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu namorado Henrique, que embora longe, sempre me apoiou e compreendeu!! Obrigada meu amor pelas palavras de incentivo que me fizeram enfrentar esses dois anos com um sorriso no rosto!

Agradeço à Sueli, Mário, Sâmia e Ari, pelo carinho, atenção e incentivo!

À minha orientadora prof^a Dra. Ana Maria Sell pela atenção, confiança e disponibilidade! Obrigada pela contribuição com o meu crescimento científico, acadêmico e pessoal! Agradeço a dedicação como orientadora e pela maneira compreensiva com a qual sempre me atendeu!

Ao Prof. Dr. Cléverson pelo auxílio prestado na seleção dos pacientes na Clínica de Periodontia.

Aos professores, funcionários e acadêmicos das Clínicas Odontológicas da UEM e da UNINGÁ por todo auxílio prestado.

Aos pacientes que com muita paciência e boa vontade colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores da “Imuno” Rafael, Ricardo, Luiza, Sueli, Marcia e Jeane obrigada pelos ensinamentos, pela atenção e pela disponibilidade em ajudar!!

Aos técnicos do laboratório: Edina, Helen, Fabiano, Marco Antônio, Silvana e Dona Neuza! Muito obrigado por todo auxílio, pelos conselhos, pela amizade. Aprendi muito com vocês!

Às amigas de Maringá: Carmem, Josiele, Carol e Flávia, obrigada pelo carinho, pelas palavras amigas e de coragem, pelo apoio nos momentos de depressão e principalmente, por trazerem alegria para minha vida e tornarem a minha estadia em Maringá mais feliz.

Aos amigos da Pós graduação, Christiane, Pâmela, Flávia, Joana, Josiane, Camila, Luciana J., Priscila, Hugo, Luciana C., Elizângela, Marcela, Carla, Roger, Patrícia, pela convivência harmoniosa, pelo aprendizado e incentivo.

Às meninas que me ajudaram na coleta das amostras, Camila, Josiane, Amarilis, Joana, Christiane, Luciana e Flávia! Muito obrigada!

As amigas de longe Magda, Laísa e Elaine que embora longe, compartilharam todos os momentos comigo! Os dias de alegrias e os dias difíceis! Obrigada meninas!

A secretária da pós-graduação Luciane, que além de muito competente, está sempre pronta a ajudar com boa vontade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo para a realização deste trabalho.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho! Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

Superação é ter a humildade de aprender com o passado,
não se conformar com o presente e desafiar o futuro;

(HUGO BETHLEM)

Posso não ter ido aonde queria ir,
mas creio que estou exatamente onde deveria estar.

(Douglas Adams)

Associação entre polimorfismos no gene do sistema de grupo sanguíneo Duffy e em região reguladora de *IL8* com a periodontite crônica

RESUMO

Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo Duffy, também conhecidos como DARC, *Duffy antigen receptor for chemokines*, atuam como receptor para a quimiocina Interleucina-8 (IL-8). IL-8 tem um papel importante na patogênese da periodontite crônica devido às propriedades quimiotáticas sobre neutrófilos. O objetivo deste estudo foi verificar uma possível associação entre os polimorfismos no gene do sistema de grupo sanguíneo Duffy e os SNPs -353T/A, -845T/C, -738T/A na região promotora do gene *IL8* com a suscetibilidade à periodontite crônica. Para tanto, 124 indivíduos com a doença e 187 controles que procuraram atendimento em Clínicas Odontológicas de Instituições de Ensino, em Maringá, PR, foram selecionados. O DNA foi extraído pela metodologia de *salting out*. As genotipagens de Duffy e dos polimorfismos na região promotora do gene *IL8* foram realizadas por PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length*). As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de qui quadrado com correção de Yates ou Teste Exato de Fisher e a possibilidade de associação foi avaliada por odds ratio com intervalo de confiança de 95%. Em indivíduos não fumantes o alelo -845C, o genótipo -845TC e o haplótipo CTA estiveram associados positivamente com a periodontite crônica (alelo-845C: 3,6% vs. 0,4%; OR=10,4; IC95%=1,1-95,6; genótipo-845TC: 7,3% vs. 0,7%; OR=10,1; IC95%=1,1-91,2; haplótipo CTA: 3,6% vs. 0,4%; OR=10,1; IC95%=1,3-259,8). Pacientes afro-brasileiros que apresentavam o SNP-67T>C na região 5' não traduzida do gene *FY*, em homozigose ou heterozigose, concomitantemente com o SNP *IL8* -353A, exibiram resistência à periodontite crônica ($p=0,032$; OR=0,25; IC95%= 0,078- 0,79); e os indivíduos mulatos (mistura de caucasianos e afrodescendentes), com os SNPs -67T>C e/ou 265C>T, em homozigose ou heterozigose, associadas com o SNP *IL8* -353T, apresentaram suscetibilidade à doença ($p=0,042$; OR=2,57; IC 95%= 1,105-5,98). A expressão de DARC eritroide e do SNP -353T>C no gene *IL8* podem estar associados com a periodontite crônica: IL-8 livre no plasma liga-se a neutrófilos assim dessensibilizando-os e evitando a sua migração para o foco da infecção e consequentemente minimizando lesões teciduais.

Palavras chaves: Antígenos de grupos sanguíneos; Sistema de grupo sanguíneo Duffy; Interleucina-8; Periodontite; Estudos de associação Genética; Receptor de quimiocina.

Association between the Duffy blood group system genes polymorphisms and the regulatory region of *IL8* in chronic periodontitis

ABSTRACT

The antigens of the Duffy blood group system, also known as Duffy antigen receptor for chemokines (DARC), act as a receptor for the interleukin-8 (IL-8) chemokine. IL-8 plays an important role in the pathogenesis of chronic periodontitis due to its chemotactic properties on neutrophils. The aim of this study was to investigate a possible association of the Duffy blood group gene polymorphisms and the -353T/A, -845T/C, -738T/A SNPs in the promoter region of the *IL8* gene in the chronic periodontitis. One hundred and twenty-four individuals with chronic periodontitis and 187 controls treated in dental clinics of teaching institutions in Maringá, Brazil, were enrolled in this study. DNA was extracted by the salting-out method. The Duffy genotypes and polymorphisms in the promoter region of the *IL8* gene were investigated by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Statistical analyses were conducted using the Chi square test with Yates correction or Fisher's Exact Test with the possibility of associations being evaluated by odds ratio with a 95% confidence interval. In nonsmokers, the -845C allele (3.6% vs 0.4%; OR = 10.4; CI95%=1.1-95.6), -845T/C genotype (7.3% vs 0.7%; OR = 10.1; CI95%=1.1-91.2) and the CTA haplotype (3.6% vs 0.4%; OR = 10.1; CI95%=1.3-259.8) were positively associated with chronic periodontitis. Afro-Brazilians patients who were homozygous or heterozygous for the -67T>C SNP in the 5' untranslated region of the *FY* gene together with the -353A SNP of the *IL8* gene exhibited resistance to chronic periodontitis (p-value 0.032; OR = 0.25). Moreover, Mulattos (Afro and Caucasians mixed Brazilians) patients with the -67T>C or -265C>T SNPs associated with the -353T allele of the *IL8* gene showed susceptibility for the disease (p-value 0.042; OR = 2.57; CI 95%= 1.105-5.98). DARC erythroid expression and *IL8*-353T>A SNP could be associated with periodontitis: IL-8 free in the plasma binds to neutrophils thus desensitizing them and preventing their migration to the focus of infection and minimizing tissues lesions.

Keywords: Blood group antigens; Duffy blood-group system; Interleukin-8; Periodontitis; Genetic association studies; Chemokine receptors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Contribuição de DARC endotelial e eritroide para a função de quimiocinas.....	20
Tabela 1.PCR-RFLP: primers, ciclos e enzimas utilizados na definição dos polimorfismos na região promotora de <i>IL8</i>	39
Tabela 2. Características da população controle e de pacientes com periodontite crônica.....	40
Tabela 3. Distribuição dos genótipos e alelos do Sistema de Grupo Sanguíneo Duffy em pacientes com periodontite crônica e controles.....	41
Tabela 4. Frequência alélica, genotípica e haplotípica dos polimorfismos -845T>C, -738T>A -353T>A no gene <i>IL8</i> em pacientes com periodontite e no grupo controle.....	42
Tabela 5. Distribuição das frequências de alelos <i>FY</i> com presença e ausência dos SNPs 265T>C e -67T>C em pacientes com periodontite crônica e controles.....	43
Tabela 6. Frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos -845T>C, -738T>A e -353T>A de <i>IL8</i> em pacientes e controles em pacientes e controles do grupo étnico afro-brasileiros e pardos.....	44
Tabela 7. Distribuição de genótipos <i>FY</i> com e sem os SNPs-67T>C e/ou 265T>C versus o SNP <i>IL8</i> -353T>A, em pacientes com periodontite crônica e controles.....	45

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas:

BMC Medical Genetics Disponível em:
<http://www.biomedcentral.com/bmcmedgenet/authors/instructions>

Sumário

1.CAPÍTULO I.....	13
1.1.Sistema de grupo sanguíneo Duffy.....	13
1.2.Interleucina-8 (IL-8).....	15
1.3.Glicoproteína Duffy: receptor para quimiocinas	15
1.4.Periodontite Crônica.....	16
1.5.Relação entre IL-8 e DARC na patogênese da periodontite crônica.....	19
2.JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	22
3.1. Geral	22
3.2. Específicos.....	23
4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
5.CAPÍTULO II.....	31
Artigo: Associação entre os polimorfismos no gene do sistema de grupo sanguíneo Duffy e em região reguladora de <i>IL8</i> com a periodontite crônica	31
6. CAPITULO III.....	58
6.1. Conclusões	58
6.2. Perspectivas Futuras	58
Anexo 1	59
Anexo 2	61

CAPÍTULO I

1.1. Sistema de grupo sanguíneo Duffy

O Sistema de Grupo Sanguíneo Duffy foi descoberto em 1950, por Cutbush e cols., pela detecção de uma aglutinina no soro de um paciente hemofílico, politransfundido. Esse anticorpo foi chamado anti-Fy^a, em homenagem ao paciente em questão, Sr. Duffy. Anti-Fy^a reagia com 64,9% das 205 amostras de sangue testadas de indivíduos não relacionados na população inglesa⁽¹⁾. Um ano depois, o anticorpo anti-Fy^b, que define o par antitético do antígeno Fy^a, foi descoberto por Ikin e cols., em uma paciente multípara que foi exposta ao antígeno Fy^b transplacentário⁽²⁾.

A partir dos estudos sorológicos do Sistema Duffy, foi observado que Fy^a e Fy^b são os principais antígenos desse sistema. Esses antígenos estão presentes nos eritrócitos e células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares em diversos tecidos, exceto no cérebro, onde a expressão Duffy está localizada nas células de Purkinje⁽³⁾.

O gene *FY* está localizado no braço longo do cromossomo 1 na região 1q22-23. Ele é constituído de 1572 nucleotídeos, distribuídos em dois éxons e um íntron. O éxon 1 apresenta 55 nucleotídeos que codificam 7 aminoácidos, o íntron apresenta 479 nucleotídeos, enquanto o éxon 2 tem 1038 nucleotídeos e codifica 329 aminoácidos⁽⁴⁾. A glicoproteína Duffy codificada pelo gene *FY* apresenta massa molecular entre 35 à 43 kDa e é composta por 336 aminoácidos. Ela é constituída por sete hélices hidrofóbicas com um domínio amino-terminal extracelular, três alças extracelulares, três alças citoplasmáticas e um domínio carboxi-terminal citoplasmático^(5,6,7).

Os antígenos Fy^a e Fy^b estão localizados no domínio extracelular da glicoproteína Duffy⁽⁷⁾ e são codificados por duas formas alélicas do gene *FY*, os alelos *FY*01* e *FY*02*, respectivamente, que diferem por uma simples substituição de base no nucleotídeo 125. No alelo *FY*01*, a base é guanina (G) e no alelo *FY*02* a base é adenina (A). Isso produz um códon para glicina no aminoácido 42 no alelo *FY*01* e um códon para ácido aspártico no alelo *FY*02*. Essa substituição de um aminoácido no domínio aminoterminal da proteína é suficiente para definir os dois antígenos antitéticos e essa variação leva à identificação dos fenótipos Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+)⁽⁸⁾.

Entretanto, a maioria dos indivíduos de origem africana são designados “Duffy negativos” não expressam os antígenos Fy^a e Fy^b, fenótipo Fy(a-b-). Este fenótipo é devido a uma mutação pontual, uma única troca de base, timina (T) por citosina (C) na posição -67 (-

67T>C), da região 5' não traduzida do gene *FY*^(8,9). Essa alteração leva a uma interrupção no fator de transcrição eritroide GATA, resultando na ausência de expressão do antígeno *Fy*^b apenas no eritrócito⁽¹⁰⁾. A presença do SNP-67T>C na forma heterozigota está associada a diminuição da expressão deste antígeno nos eritrócitos⁽¹¹⁾. O fenótipo Duffy negativo está presente em aproximadamente dois terços dos afro-americanos, devido à mistura racial, e, em contraste, em pessoas de descendência europeia este fenótipo é raro⁽¹²⁾.

Outros polimorfismos raros no gene *FY* incluem o polimorfismo no nucleotídeo 265C>T, que provoca uma mudança no aminoácido arginina por uma cisteína (Arg89Cys) na posição 89 da glicoproteína Duffy resultando no fenótipo “*Fy*^b fraco” com redução de 90% da expressão de *Fy*^b nos eritrócitos, e o polimorfismo 298 G>A responsável pela substituição de alanina por treonina no aminoácido 100 do gene *FY*^(13,14). A presença do polimorfismo 298 G>A não altera a expressão do antígeno *Fy*^b, este polimorfismo foi encontrado sempre associado ao polimorfismo 265 C>T e, além disso, ao SNP 298 G>A apresenta alta frequência populacional (próxima a 30%) em mais de um grupo racial. Assim, o SNP 265 C>T é o polimorfismo crítico e responsável pela expressão fraca dos antígenos Duffy⁽¹⁵⁾.

A grande diversidade de distribuição dos determinantes antigênicos Duffy, nos diversos grupos étnicos, é característica desse sistema de grupo sanguíneo. O antígeno *Fy*^a é prevalentes entre chineses, japoneses e melanésios, porém apresentam baixa frequência entre afro-brasileiros africanos. Por outro lado, o antígeno *Fy*^b é mais abundante na população caucasiana do que em asiáticos e em afro-brasileiros africanos. Em americanos, o fenótipo *Fy*(a-b-) é extremamente raro fora da população negra^(16,17).

Novaretti e cols. (2000)⁽¹⁸⁾ estudaram a frequência fenotípica para o Sistema Duffy em doadores de sangue da cidade de São Paulo e evidenciaram o fenótipo *Fy*(a+b+) em 41,4% dos caucasóides, 22,0% dos mulatos e 1,6% dos afro-brasileiros. Quanto ao fenótipo *Fy*(a-b-) verificaram uma frequência de 1,08% em caucasóides, 32,41% em mulatos e 66,92% em afro-brasileiros.

Estudo realizado com doadores de sangue do Estado do Paraná, por Guelsin e cols., 2011, encontrou o genótipo *FY*01/FY*01* em 12,60% dos indivíduos, *FY*01/FY*02* em 48% e *FY*02/FY*02* em 39,50% das amostras. O SNP-67T>C também foi avaliada e para este polimorfismo 2,5% das amostras foram homozigotas (-67C/C), 19,5% heterozigotas (-67T/C) e a grande maioria, 78%, não possuía a mutação (-67T/T). Todas as amostras homozigotas (-67C/C) tinham o genótipo *FY*02/FY*02*, que corresponde ao fenótipo *Fy*(a-b-). Dentre os heterozigotos -67T/C, 44,87% tinham o genótipo *FY01/FY*02*, ou seja, expressaram o fenótipo

Fy(a+b-) e 55,13% foram *FY*02/FY*02*, cujo fenótipo deduzido foi Fy(a-b+), o qual é caracterizado pela redução na expressão do antígeno Fy^b nas hemácias⁽¹⁹⁾.

1.2. Interleucina-8 (IL-8)

As quimiocinas regulam o trânsito de leucócitos, de forma que desempenham papéis importantes no desenvolvimento, homeostase e funções do sistema imune, além de terem efeito sobre células do sistema nervoso central e angiogênese. Entre as citocinas, a IL-8 é a que melhor representa o protótipo capaz de promover quimiotaxia celular. IL-8 é membro da família de α -quimiocinas e também conhecida pela sigla CXCL8, nomenclatura derivada da estrutura proteica onde C-X-C significa dois resíduos de cisteína interpostos pelo resíduo de outro aminoácido qualquer (exceto cisteína) e L significa que a molécula representa um ligante⁽²⁰⁾. Seu gene está localizado no cromossomo 4q13-q21, sendo constituído por quatro éxons e três íntrons. A IL-8 é produzida principalmente por fagócitos mononucleares do sangue, mas também por células endoteliais, epiteliais, sinoviais, fibroblastos, condrócitos e células tumorais^(21,22,23).

1.3. Glicoproteína Duffy: receptor para quimiocinas

Receptores de quimiocinas ativam múltiplas vias de sinalização intracelulares que regulam a maquinaria intracelular quimiotática, que então impulsiona as células para a direção escolhida. Os receptores típicos de quimiocinas são funcionalmente ligados à fosfolipase via proteínas G: a ativação desses receptores é acompanhada por uma cascata de eventos intracelulares levando a geração de trifosfato de inositol, liberação de cálcio e a ativação da proteína quinase C⁽²⁴⁾. Quimiocinas também interagem com outra subfamília de receptores, os quais não fazem essa sinalização, porque não possuem um motivo DRYLAIV, altamente conservado na segunda alça intracelular da proteína, que é conhecido por estar associado com a sinalização da proteína G e por isso são chamados de receptores atípicos de quimiocinas. Entre eles está o sistema de grupo sanguíneo Duffy que pode ser considerado como um receptor de quimiocina “silencioso”⁽²⁵⁾.

Estudos publicados em 1994 demonstraram que a organização dos dois éxons do gene *FY* é a mesma encontrada nos genes de outros receptores de quimiocinas^(6,26,27). A partir de observações experimentais anteriores, nas quais IL-8 ligava-se minimamente a eritrócitos Duffy negativos, quando anticorpos monoclonais para os antígenos Duffy bloqueavam a ligação de IL-8 em eritrócitos Duffy positivo, e que a IL-8 também impedia a ligação e a invasão por *P. knowlesi* em hemácias, os antígenos eritrocitários Duffy foram denominados

DARC (*Duffy Antigen Receptor Chemokines*)⁽²⁸⁾. O domínio N-terminal extracelular, que carrega os determinantes do grupo sanguíneo, está ligado com o quarto domínio extracelular via uma ponte dissulfeto. Esses domínios criam uma fenda de ligação onde as quimiocinas podem se ligar^(29,30).

DARC é o mais promíscuo entre os receptores de quimiocinas, pois se liga a, pelo menos, 20 diferentes quimiocinas C-C e C-X-C; embora com uma ampla afinidade, todos os ligantes de DARC pertencem ao subconjunto “inflamatório”⁽³¹⁾. Além de ligar-se a quimiocinas, DARC também é ligante de outras moléculas como tetraspanin CD82⁽³²⁾, vírus HIV-1^(33,34) e dos parasitas da malária, *Plasmodium vivax* e *knowlesi*, que invadem os eritrócitos após a ligação a DARC^(28,35).

1.4. Periodontite Crônica

A periodontite é uma doença polimicrobiana, multifatorial, que é primariamente causada por estímulo de bactérias Gram-negativas que se acumulam no sulco gengival e tem uma propagação intimamente ligada à resposta imunoinflamatória do hospedeiro^(36,37). O processo inflamatório na periodontite é um dos fatores responsáveis pelo dano tecidual, que culmina na formação de bolsa periodontal e destruição do ligamento periodontal e suporte ósseo adjacente e consequente perda de dentes⁽³⁸⁾.

O fator que inicia e promove a doença é a composição do biofilme bacteriano que se instala sobre a superfície dos dentes, porém sua progressão é dependente de outros fatores, tais como: a condição de saúde sistêmica do indivíduo, a presença de hábitos de risco à doença, como fumar cigarros, e a composição genética e epigenética do indivíduo⁽³⁹⁾. Juntos estes fatores determinarão o chamado “fenótipo clínico” do hospedeiro⁽⁴⁰⁾.

Em 1999, o Workshop Internacional para Classificação de Doença Periodontal propôs uma classificação baseada nas diferentes apresentações clínicas da periodontite, relacionadas à microbiota subgengival associada, à composição genética do hospedeiro, aos fatores ambientais e doenças sistêmicas associadas. Isto levou à divisão da periodontite inflamatória em quatro grandes categorias: periodontite crônica, periodontite agressiva, periodontite com manifestações de doenças sistêmicas e doença periodontal necrosante⁽⁴¹⁾.

O biofilme bacteriano inicia a inflamação gengival dando origem à gengivite, que é caracterizada pela presença de inflamação na margem gengival, pelas alterações na cor, forma e contorno da gengiva, sangramento e edema. A gengivite é reversível se a placa microbiana for removida e medidas eficazes de controle da placa forem instituídas⁽⁴²⁾. Segundo publicação da

American Academy of Periodontology (1999)⁽⁴³⁾ as observações histológicas têm subdividido a gengivite em 3 estágios: lesões inicial, precoce e estabelecida.

A lesão inicial aparece como uma resposta inflamatória aguda que se desenvolve 2 a 4 dias após o acúmulo de biofilme bacteriano. A lesão é localizada no sulco gengival, no epitélio juncional e tecido conjuntivo adjacente. Ocorrem alterações na rede vascular com o aumento da permeabilidade vascular. Os fluídos e as proteínas exsudativas causam tumefação dos tecidos e influxo de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio juncional. Essas mudanças iniciais são devidas a quimioatração de neutrófilos pelos constituintes das bactérias e pelo efeito da vasodilatação promovidos por produtos bacterianos, assim como a ativação dos sistemas do hospedeiro, tais como sistema do complemento, cininas e ácido araquidônico.

A lesão precoce é caracterizada pelo infiltrado de células linfoides, dominados por linfócitos T. Os neutrófilos liberam as metaloproteínases (MMP) que levam à destruição do colágeno e assim, acomodando o infiltrado celular.

As características do infiltrado inflamatório crônico das lesões precoce e estabelecida, assim como a proliferação do epitélio juncional e destruição do colágeno, são consistentes com a ativação de fagócitos mononucleares e fibroblastos por produtos bacterianos, com o recrutamento e ativação do sistema imune no local e citocinas. A progressão da lesão de inflamação aguda, depois com células T e predominância de células B, é provavelmente orquestrada por uma progressão de citocinas, responsáveis pelo recrutamento, diferenciação e crescimentos de tipos celulares característicos, com progressiva cronicidade da lesão.

A periodontite é diferenciada da gengivite pela perda do tecido conjuntivo de inserção ao dente na presença da inflamação gengival, perda de ligamento periodontal com desinserção do cemento e reabsorção do osso alveolar. Juntamente com a perda de inserção há migração do epitélio juncional ao longo da superfície radicular e da reabsorção óssea. Histopatologicamente a lesão periodontal é em muitos pontos similar a lesão estabelecida do processo de gengivite, com predominância de plasmócitos, perda de elementos do tecido conjuntivo, mas em adição há reabsorção óssea. Apesar dessa similaridade, evidências mostram que a periodontite não é uma consequência inevitável da gengivite, e os mecanismos patogênicos e os fatores que levam a progressão da gengivite para periodontite não são claros.

Modelos clínicos da atividade da periodontite incluem situações de progressão contínua, na qual a perda de inserção ocorre numa razão lenta por longo período de tempo, e situações nas quais a perda de inserção ocorre de forma relativamente rápida num período de tempo curto. Dados clínicos sugerem que esses mecanismos podem ocorrer em diferentes pacientes,

ou em diferentes sítios, ou em diferentes tempos no mesmo indivíduo, implicando que a patogênese da perda de inserção periodontal pode diferir entre pacientes, sítios e tempos⁽⁴³⁾.

Os meios pelos quais as bactérias periodontopatogênicas iniciam e perpetuam a inflamação e a destruição tecidual características da periodontite tem sido área de investigação nos últimos anos. As bactérias associadas à periodontite podem causar destruição no periodonto marginal via dois mecanismos: 1) pela ação direta dos subprodutos de metabolismo e enzimas bacterianas; 2) pelo estímulo à liberação de mediadores inflamatórios de células hospedeiras, promovendo a autodestruição tecidual⁽⁴³⁾. Assim, tanto bactérias com potencial patogênico quanto a qualidade da resposta do hospedeiro constituem duas faces da etiologia da periodontite^(45,46).

A prevalência das doenças periodontais varia significativamente nas diferentes regiões do mundo^(47,48,49,50). Em 2002, nos Estados Unidos, a estimativa era de que 19,9% e 7,3% das pessoas com idade entre 30 e 90 anos tinham perda de inserção (NIC) ≥ 5 e ≥ 7 mm, respectivamente^(47,48). No Reino Unido, o exame nacional utilizou o Índice Periodontal Comunitário (CPI) e estimou que 42% das pessoas entre 35 e 44 anos e 70% com idade entre 55 e 64 anos tinha NCI $>3,5$ mm⁽⁴⁹⁾. Há poucas informações sobre a ocorrência de doenças periodontais na América Latina e especialmente no Brasil. Estudo realizado por Susin e cols (2004) com indivíduos brasileiros mostrou que setenta e nove por cento (79%) e 52% dos indivíduos e 36% e 16% dos dentes por indivíduo tinham NIC $>$ ou $= 5$ e $>$ ou $= 7$ mm, respectivamente. Através do modelo multivariado mostraram que indivíduos com idade entre 40 à 49 e $>$ ou $= 50$ anos tinham um risco de 3,0 e 5,9 vezes maior para NIC moderada e 7,4 e 25,4 vezes maior risco para NIC grave, em comparação com os indivíduos de 30 à 39 anos. Fumantes moderados apresentaram um risco significativamente maior para NIC moderada (razão de risco relativo [RRR] = 2,1) e NIC grave (RRR = 3,4), e fumantes pesados tinham um risco maior para NIC moderado (RRR = 3,0) e NIC grave (RRR = 8,2), em comparação aos não-fumantes. Um risco significativamente maior de NIC grave também estava presente no sexo masculino (RRR = 1,6), indivíduos com status socioeconômico baixo (RRR = 1,8) ou médio (RRR = 1,6), e aqueles com um histórico de consultas odontológicas irregulares (RRR = 2,1). Estado diabético e raça não mostraram associações significativas com CAL após o ajuste para outros efeitos. Recentemente, Haas e cols. (2012)⁽⁵¹⁾ publicaram um estudo longitudinal de 5 anos e demonstraram que a progressão da perda de inserção periodontal (NIC) foi comum na população do Sul do Brasil. No total, 56% e 12% dos indivíduos tinham progressão NIC ≥ 3 e ≥ 5 mm, respectivamente, e 2 ou mais dentes eram afetados. A progressão NIC foi vista aumentar com a idade, mas estabilizar no grupo de 50 anos de idade ou mais. Sexo masculino, não-

caucasianos e indivíduos de baixo poder econômico mostraram maiores taxas de progressão da doença do que indivíduos do sexo feminino, caucasianos e com alto poder econômico, respectivamente⁽⁵¹⁾.

1.5. Relação entre IL-8 e DARC na patogênese da periodontite crônica

A IL-8 é conhecida por ser um potente indutor de quimiotaxia para neutrófilos. Experimentos de imobilização de IL-8 por glicosaminoglicanas (GAGs) e heparan sulfato (HS), demonstraram que as quimiocinas são um pré-requisito à indução, *in vivo*, da emigração neutrofílica⁽⁵²⁾. Em contraste, quimiocinas plasmáticas solúveis, que podem atuar em neutrófilos antes da adesão, foram relacionadas aos efeitos anti-adesivos e anti-emigratórios⁽⁵³⁾. Assim, a fim de afetar os leucócitos circulantes e induzir a adesão de leucócitos ao endotélio, as quimiocinas que são produzidas por células de diferentes tecidos têm que chegar à superfície da célula endotelial, onde são capturadas por GAGs⁽⁵⁴⁾.

Estudos imunohistoquímicos sobre a expressão de DARC endotelial em vênulas e veias pequenas, têm demonstrado que esta proteína pode mediar a ligação de quimiocinas e a transcitose das mesmas para o lúmen do vaso, assim a IL-8 é imobilizada por GAGs e pode ativar a migração dos neutrófilos para os tecidos⁽⁵⁵⁾.

A função de DARC eritroide, neste contexto, é, portanto, proteger os leucócitos sanguíneos das quimiocinas excedentes no plasma, pela redução de quimiocinas plasmáticas solúveis (via ligação DARC/quimiocina). Desta forma a dessensibilização dos neutrófilos é diminuída e, indiretamente, o sinal de codificação de quimiocinas imobilizadas na superfície das células endoteliais é melhorado⁽⁵⁴⁾. Este mecanismo é ilustrado na Figura 1.

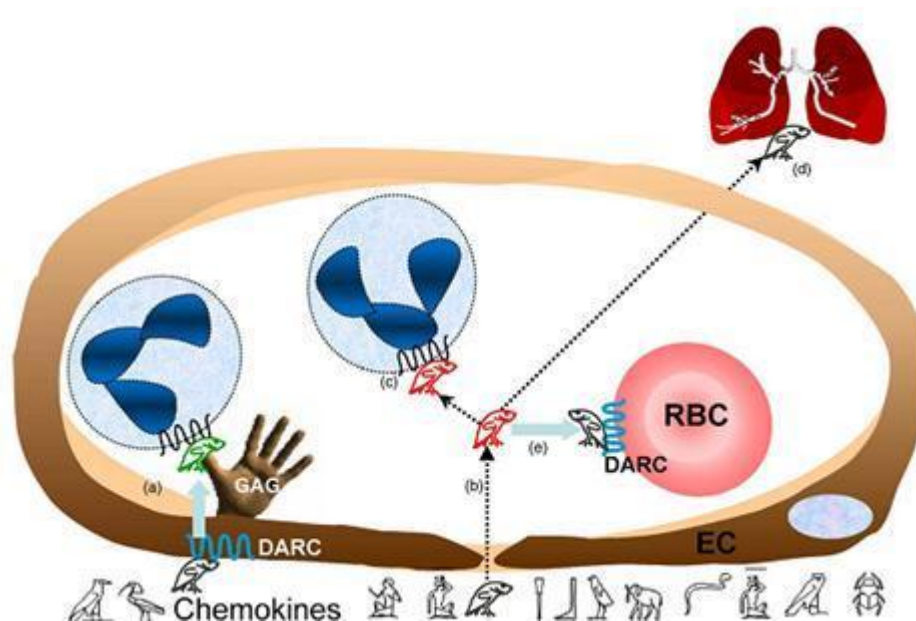


Figura 1. Contribuição de DARC endotelial e eritroide para a função de quimiocinas.

Quimiocinas (representado como hieróglifos) são produzidas no compartimento extravascular pelas células dos tecidos. Estas quimiocinas (de cor preta) não são "vistas" pelos leucócitos em circulação e, nesse local microanatômico, não têm qualquer influência sobre a emigração de leucócitos. DARC endotelial transporta quimiocinas subluminais em direção luminal, seguida de imobilização de quimiocinas pelas GAGs(a). As quimiocinas GAG ligadas (em verde) podem ativar as integrinas de leucócitos e converter o rolamento de leucócitos para a adesão firme. Alternativamente, as quimiocinas podem difundir-se através das junções das células endoteliais(b). Esta rota pode ignorar as GAGs de superfície e as quimiocinas solúveis ficam livres no plasma. Quimiocinas plasmáticas (em vermelho) se direcionam à receptores cognatos em leucócitos do sangue(c), resultando em "dessensibilização" leucocitária e inibição da adesão na célula endotelial e emigração para o tecido. Após ligar à superfície DARC eritroide, as quimiocinas plasmáticas perdem a capacidade de dessensibilizar os leucócitos(e). Estas quimiocinas (em preto novamente) associadas à DARC eritroide não podem induzir a adesão de leucócitos nem a dessensibilização. Assim, a mesma molécula de quimiocina (aqui representada em preto, vermelho ou verde) pode desempenhar diferentes papéis funcionais no processo de adesão leucócito-célula endotelial e emigração. As interações de quimiocinas com DARC determinam as suas posições microanatômicas e, a sua função. Se não ligadas à DARC eritroide, as quimiocinas desaparecem do plasma para os pulmões e os rins(d) cujo resultado funcional é desconhecido. Fonte: Rot, 2005⁽⁵⁴⁾

Devido às propriedades quimioatrativas para neutrófilos, a IL-8 tem um papel importante na patogênese da periodontite^(56,57). A IL-8 secretada localmente induz o extravasamento de neutrófilos do sangue periférico para o sítio afetado e também atrai numerosos neutrófilos presentes na lâmina própria e no epitélio gengival⁽⁵⁸⁾. O número de neutrófilos e a concentração de mediadores da inflamação são maiores em sítios de periodontite, quando comparado aos sítios saudáveis. A relação entre o número de neutrófilos no fluido crevicular gengival e o diagnóstico de doença periodontal ativa foi reconhecida em meados da década de 80⁽⁵⁹⁾. No sulco gengival os neutrófilos formam uma barreira entre o epitélio e o biofilme e protegem o epitélio e o tecido conjuntivo subjacente da invasão bacteriana. Os neutrófilos são conhecidos como células de proteção ao periodonto^(60,61). Desordens genéticas que levam a defeitos de adesão dos neutrófilos estão associadas à destruição periodontal localizada, rápida e progressiva⁽⁶²⁾. Segundo Nussbaum e Shapira

(2011)⁽⁶³⁾, a neutropenia e deficiências relacionadas à quimiotaxia e à fagocitose por neutrófilos (PMN), geralmente resultam em aumento no índice e gravidade de destruição periodontal. Deficiências quantitativas são acompanhadas, em geral, por destruição periodontal generalizada, enquanto os defeitos qualitativos frequentemente associam-se a periodontite localizada. Por outro lado, os neutrófilos também liberam produtos tóxicos (como colagenase ou citocinas pró-inflamatórias) que contribuem para a destruição dos tecidos de suporte dos dentes⁽⁶⁴⁾. A contínua e excessiva presença de IL-8 pode contribuir para um acúmulo de neutrófilos ativados no tecido conjuntivo periodontal e conseqüentemente a destruição local dos tecidos periodontais^(65,66).

O conhecimento e a compreensão da atividade dos neutrófilos no processo inflamatório e na destruição tecidual na periodontite são essenciais na correlação entre o perfil celular com a presença e a gravidade de doença periodontal ativa⁽⁶⁷⁾.

Fatores genéticos podem afetar o prognóstico da periodontite e polimorfismos em genes de proteínas despertaram interesse de estudo nos últimos anos e, assim, vêm sendo investigados com a periodontite^(44,45,68,69,70). A base para o polimorfismo entre os alelos são as diferentes mutações que podem ocorrer na sequência de DNA. 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 um nucleotídeo é trocado por outro qualquer (A>T, A>G, A>C, G>C, G>T e vice-versa). Alteração genética como esta pode modificar os níveis de transcrição de um gene, ou seja, o polimorfismo pode ocorrer na 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⁽⁷¹⁾.

O SNP -353T>A, localizado na região promotora do gene *IL8* e também encontrado na literatura como -251T>A e rs4073T>A, foi associado à várias doenças^(72,73,74,75,76,77). Os nucleotídeos que se alternam são a adenosina (A) e a timina (T) e, portanto, a população pode apresentar os genótipos TA (heterozigoto), AA ou TT (homozigotos). O alelo A foi associado a elevados níveis de transcritos de *IL8* após a estimulação do sangue total com lipopolissacarídeos⁽⁷²⁾. O SNP-353T>A pode estar em desequilíbrio de ligação com variantes funcionais de outras posições do locus *IL8*, formando haplótipos^(78,79). Os haplótipos ocorrem quando SNPs estão localizados em proximidade física entre si no cromossomo e são herdados em blocos, sem recombinação entre cromossomos parenterais. Quando uma análise genética inclui haplótipos, a influência cooperativa de diferentes polimorfismos no desequilíbrio de

ligação é considerada, ao invés de um polimorfismo individualmente, e então a influência potencial de um fator genético é mais confiante⁽⁴⁵⁾.

A existência de polimorfismo no gene *FY* também fornece uma oportunidade única para estudar a contribuição de DARC eritroide para a saúde humana e doenças, inclusive para a periodontite. Decorrente do SNP -67T>C, a maioria dos indivíduos de origem africana não apresentam antígenos Duffy em suas hemácias. Recentemente, dois estudos de associação correlacionaram o polimorfismo no gene *FY* (SNP -67T>C na região eritroide GATA box) com o desenvolvimento de neutropenia étnica benigna⁽⁸⁰⁾ e com a suscetibilidade à asma e aos altos níveis de IgE⁽⁸¹⁾. Em ambos os casos, os patomecanismos moleculares e celulares permaneceram completamente inexplorados. Estudos que correlacionam o papel de DARC e o desenvolvimento da periodontite crônica, não foram realizados até o momento, segundo o nosso conhecimento.

2. JUSTIFICATIVA

Há evidências de que a suscetibilidade do hospedeiro desempenhe um importante papel na iniciação e na progressão da periodontite. Pacientes não são igualmente suscetíveis a esta doença, e a suscetibilidade individual para o estímulo microbiano na periodontite é determinado, em parte, pela predisposição genética. Um número de polimorfismos genéticos tem sido associado com o risco de periodontite crônica e agressiva em várias populações. A suscetibilidade pode assim ser largamente definida em termos de marcadores genéticos individuais ou de grupos étnicos.

Devido às propriedades quimiotáticas sobre leucócitos polimorfonucleares, a Interleucina 8 tem um papel importante na imunopatogênese da periodontite. DARC é um receptor “silencioso” para IL-8 e, assim, influencia nas propriedades quimiotáticas de IL-8. Desta forma, o estudo de polimorfismos genéticos que correlacionem a produção de IL-8 e a expressão de DARC (receptor para IL-8) pode contribuir para o entendimento na imunopatogênese de doenças inflamatórias como a periodontite crônica.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O objetivo deste trabalho foi investigar se os alelos e genótipos do sistema de grupo sanguíneo Duffy e os polimorfismos -353(T/A), -738(T/A) e -845(T/C) na região promotora do

gene *IL8* estão relacionados com a suscetibilidade a periodontite crônica, em uma população brasileira.

3.2. Específicos

Realizar a genotipagem do sistema de grupo sanguíneo eritrocitário Duffy em pacientes com periodontite crônica e controles;

Identificar os SNPs -845 T>C, -738 T>A, e -353 T>A no gene promotor da *IL-8* em pacientes com periodontite crônica e controles;

Estimar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas para os polimorfismos estudados e comparar estas frequências entre pacientes e controles;

Identificar a associação dos alelos e genótipos do sistema de grupo sanguíneo Duffy e os SNPs -353T/A, -845T/C, -738T/A na região promotora do gene *IL8* com a suscetibilidade à periodontite crônica.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cutbush M, Mollison PL, Parkin DM. A new human blood group. *Nature* 1950;165:188-9.
2. Ikin EW, Mourant AE, Pettenkofer HJ, Blumenthal G. Discovery of the expected haemagglutinin, anti-Fyb. *Nature* 1951; 168(4288):1077-8.
3. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Pogo AO. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals. *Blood* 1995; 85(3):615-21.
4. Iwamoto S, Omi T, Kajii E, Ikemoto S. Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44-amino acid residue. *Blood* 1995; 85(3):622-6.
5. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Williams K, Gulati S, Pogo AO. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(22):10793-7.
6. Neote K, Mak JY, Kolakowski LF Jr, Schall TJ. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood* 1994; 84(1):44-52.

7. De Brevern AG, Wong H, Tournamille C, Colin Y, Le Van Kim C, Etchebest C. A structural model of a seven-transmembrane helix receptor: the Duffy antigen/receptor for chemokine (DARC). *Biochim Biophys Acta* 2005; 1724(3):288-306.
8. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet* 1995; 10(2):224-8.
9. Iwamoto S, Li J, Sugimoto N, Okuda H, Kajii E. Characterization of the Duffy gene promoter: evidence for tissue-specific abolishment of expression in Fy(a-b-) of black individuals. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222(3):852-9.
10. Le Pennec PY, Rouger P, Klein MT, Robert N, Salmon C. Study of anti-Fya in five black Fy(a-b-) patients. *Vox Sang* 1987; 52(3):246-9.
11. Zimmerman PA, Woolley I, Masinde GL, Miller SM, McNamara DT, Hazlett F, Mgone CS, Alpers MP, Genton B, Boatman BA, Kazura JW. Emergence of FY*A(null) in a Plasmodium vivax - endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(24):13973-7.
12. Howes RE, Patil AP, Piel FB, Nyangiri OA, Kabaria CW, Gething PW, Zimmerman PA, Barnadas C, Beall CM, Gebremedhin A, Ménard D, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI. The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun* 2011; 2:266.
13. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, et al. Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/ receptor for chemokines in Fyx individuals (erratum in 95:2753). *Blood* 1998; 92:2147-56.
14. Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, Poole J, Mallinson G, Jones J, Avent ND, Daniels G. The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the Fy(b) allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br J Haematol* 1998; 103(4):1184-91.
15. Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry JR, Kosower N, Parasol N, Chaudhuri A, Reid ME. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of duffy antigens. *Transfusion* 2000; 40(3):310-20.
16. Shimizu Y, Kimura M, Settheetham-Ishida W, Duangchang P, Ishida T. Genotyping of Duffy blood group in several Thai ethnic groups. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997; 28(1):32-5.

17. Shimizu Y, Ao H, Soemantri A, Tiwawech D, Settheetham-Ishida W, Kayame OW, Kimura M, Nishioka T, Ishida T. Sero- and molecular typing of Duffy blood group in Southeast Asians and Oceanians. *Hum Biol* 2000; 72(3):511-8.
18. Novaretti MCZ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone, DAF. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo. *Rev bras hematol Hemoter* 2000; 22(1):23-32.
19. Guelsin GA, Sell AM, Castilho L, Masaki VL, Melo FC, Hashimoto MN, et al. Genetic polymorphisms of Rh, Kell, Duffy and Kidd systems in a population from the State of Paraná, southern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* [online]. 2011;33(1):21-25.
20. Remick DG. Interleukin-8. *Crit Care Med* 2005; (12 Suppl): S466-7.
21. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1045-49.
22. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol* 1993; 64:456-60.
23. Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005; 32 (Suppl 6):159-7
24. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001;2:129–34.
25. Ulvmar MH, Hub E, Rot A. Atypical chemokine receptors 2011; 10;317(5):556-68.
26. Chaudhuri A, Zbrzezna V, Polyakova J, Pogo AO, Hesselgesser J, Horuk R. Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. *J Biol Chem* 1994; 269(11):7835-8.
27. Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:593-633.
28. Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, et al. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 1993; 261(5125):1182–4.
29. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Blanchard D, Proudfoot AE, Cartron JP, and Colin Y. Close association of the first and fourth extracellular domains of the duffy antigen/receptor for chemokines by a disulfide bond is required for ligand binding. *J Biol Chem* 1997; 272:16274–16280.

30. Tournamille C, Filipe A, Wasniowska K, Gane P, Lisowska E, Cartron J P, Colin Y, Le Van Kim C. Structure–function analysis of the extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines: characterization of anti-body and chemokine binding sites. *Br J Haematol* 2003; 122:1014–1023
31. Neote K, Darbonne W, Ogez J, Horuk R, Schall TJ. Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. *J Biol Chem* 1993; 268(17):12247–9.
32. Watabe K, Bandyopadhyay S, Zhan R, Chaudhuri A, Watabe M, Pai SK, et al. Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat Med* 2006; 12(8):933–8.
33. Lachgar A, Jaureguiberry G, Le Buenac H, Bizzini B, Zagury JF, Rappaport J, et al. Binding of HIV-1 to RBCs involves the Duffy antigen receptors for chemokines (DARC). *Biomed Pharmacother* 1998; 52(10):436–9.
34. He W, Neil S, Kulkarni H, Wright E, Agan BK, Marconi VC, Dolan MJ, Weiss RA, Ahuja SK. Duffy antigen receptor for chemokines mediates trans-infection of HIV-1 from red blood cells to target cells and affects HIV-AIDS susceptibility. *Cell Host Microbe* 2008; 4(1):52–62.
35. Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinniss MH, Rothman IK. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* 1975; 189(4202):561–3.
36. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5:78-111.
37. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-44.
38. Van Dyke TE. Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis. *Periodontol* 2000 2007; 45: 10–13.
39. Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol* 2008; 79(8 Suppl):1560-8.
40. Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. Rethinking periodontal inflammation. *J Periodontol* 2008; 79(8 Suppl):1577-84.

41. Armitage GC. Desenvolvimento de um sistema de classificação para doenças periodontais e condições. *Ann Periodontol* 1999; 4:1-6.
42. Lindhe, J. *Clinical periodontology and implant dentistry*. Editora Guanabara Koogan, 5ª Edição. Rio de Janeiro, 2010.
43. American Academy of periodontology-Academy reports-Formational paper: The pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodontol* 1999; 70 (4):457-66.
44. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of *IL-6* gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003; 30:438-42.
45. Kinane DF, Hart TC. Gene and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14:430-49.
46. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2005; 32 (Suppl 6):108-29.
47. Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology* 2000 2002; 29:7-10.
48. Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol* 2004; 75(7):1033-41.
49. Morris AJ, Steele J, White DA. The oral cleanliness and periodontal health of UK adults in 1998. *Br Dent J* 2001; 191(4):186-92.
50. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão Nacional de Saúde Bucal. Levantamento epidemiológico em saúde bucal: Brasil, zona urbana, 1986. Brasília (DF); Centro de Documentação do Ministério da Saúde; 1988.
51. Haas AN, Gaio EJ, Oppermann RV, Rossing CK, Albandar JM, Susin C. Pattern and rate of progression of periodontal attachment loss in an urban population of South Brazil: a 5-years population-based prospective study. *J Clin Periodontol* 2012; 39:1-9.
52. Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, et al. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 1997; 91:385-95.

53. Ley K, Baker JB, Cybulsky MI, Gimbrone Jr MA, Luscinskas FW. Intravenous interleukin-8 inhibits granulocyte emigration from rabbit mesenteric venules without altering L-selectin expression or leukocyte rolling. *J Immunol* 1993; 151:6347–57
54. Rot A. Contribution of Duffy antigen to chemokine function. *Cytokine Growth Factor Review* 2005; 16(6):687-94.
55. Hadley TJ, Lu ZH, Wasniowska K, Martin AW, Peiper SC, Hessel-gesser J, et al. Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen. *J Clin Invest* 1994; 94:985–91.
56. Fitzgerald JE, Kreutzer DL. Localization of interleukin-8 in human gingival tissues. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10:297-303.
57. Gaiet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA, Elbim C. Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Lab Invest* 1998; 78:755-62.
58. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol* 1993; 64:456-60.
59. Miller DR, Lamster IB, Chasens AI. Role of the polymorphonuclear leukocyte in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* 1984; 11:1–15.
60. Attström R, Schroeder HE. Effect of experimental neutropenia on initial gingivitis in dogs. *Scand J Dent Res* 1979; 87:7-23.
61. Hemmerle J, Frank RM. Bacterial invasion of periodontal tissues after experimental immunosuppression in rats. *J Biol Buccale* 1991; 19:271-282.
62. Page RC. Host response tests for diagnosing periodontal diseases. *J Periodontol* 1992; 63(4 Suppl):356-366.
63. Nussbaum G, Shapira L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis. *J. Clin. Periodontol* 2011; 38:49-59.
64. Kantarci A, Oyaizu K, Van-Dyke TE. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74:66-75.

65. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9:248-66.
66. Wang D, Sadee W. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). *AAPS J* 2006; 188:515-20.
67. Bender JS, Thang H, Glogauer M. Novel rinse assay for the quantification of oral neutrophils and the monitoring of chronic periodontal disease. *J Periodontal Res* 2006; 3:214–220.
68. Freitas NM, Imbroni AV, Neves AC, Nunes FD, Pustiglioni FE, Lotufo RF. Analysis of IL-1A (-889) and TNFA (-308) gene polymorphism in Brazilian patients with generalized aggressive periodontitis. *Eur Cytokine Netw* 2007; 18: 142-7.
69. Yoshie, H, Kobayashi, T, Tai, H, and Galicia, JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000* 2007; 43:102–132.
70. Menezes NG, Colombo AP. Lack of association between the TNF-alpha -308 (G/A) genetic polymorphism and periodontal disease in Brazilians. *Braz Oral Res* 2008; 22: 322-7.
71. Thompson & Thompson. *Genética Médica*. Editora Guanabara Koogan, 6° Edição. Rio de Janeiro; 2002. p.76-82.
72. 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.
73. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, Southgate C, Easton DF, Eeles RA, Howell WM. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Research* 2002; 62:3369-3372.
74. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez G I. Assessment of the toll-like receptor 4Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer* 2007; 7:70.
75. 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.

76. Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, Vylliotis A, Wiltfang J, Avgoustidis D, Critselis E, Neukam FW, Patsouris E. The interleukin-8 (-251A/T) polymorphism is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology* 2007; 33:504 -507.
77. Goverdhan V, Ennis S, Hannan SR, Madhusudhana, KC, Cree AJ, Luff AJ, Lotery AJ. Interleukin-8 promoter polymorphism -251A/T is a risk factor for age-related macular degeneration. *British Journal of Ophthalmology* 2008; 92: 537-540.
78. Rovin BH, Lu L, Zhang X. A novel interleukin-8 polymorphism is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis. *Kidney Int* 2002; 62:261–5
79. Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, Mendes-Junior CT, Scarel-Caminaga RM. Association of haplotypes in the *IL8* gene with susceptibility to chronic periodontitis in a Brazilian population. *Clin Chim Acta* 2010; 411:1264–1268.
80. Reich D, Nalls MA, Kao WHL, Akylbekova EL, Tandon A, Patterson N, Mullikin J, Hsueh WC, Cheng CY, Coresh J, Boerwinkle E, Li M, Waliszewska A, Neubauer J, Li R, Leak TS, Ekunwe L, Files JC, Hardy CL, Zmuda JM, Taylor HA, Ziv E, Harris TB, Wilson JG. Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. *Plos Genet* 2009; 5(1):e1000360.
81. Vergara C, Tsai YJ, Grant AV, Rafaels N, Gao L, Hand T, et al. Gene encoding Duffy antigen/receptor for chemokines is associated with asthma and IgE in three populations. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178(10):1017–22.

CAPITULO II

Artigo: Associação entre polimorfismos no gene do sistema de grupo sanguíneo Duffy e em região reguladora de *IL8* com a periodontite crônica

Emília Ângela Sippert¹, Cléverson de Oliveira e Silva², Jeane Eliete Laguila Visentainer³, Ana Maria Sell^{3*}

¹Programa de Pós-Graduação e Biociências Aplicadas à Farmácia, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

²Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

³Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência:

Universidade Estadual de Maringá-Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Av. Colombo, 5790

87020-900 – Maringá, Paraná, Brasil

Fone: 55 44 3011-4864/ Fax: 55 44 3011-4931

E-mail: anamsell@gmail.com

Associação entre polimorfismos no gene do sistema de grupo sanguíneo Duffy e em região reguladora de *IL8* com a periodontite crônica

RESUMO

Introdução: Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo Duffy, também conhecidos como DARC, *Duffy antigen receptor for chemokines*, atuam como receptor para a quimiocina Interleucina-8 (IL-8). IL-8 tem um papel importante na patogênese da periodontite crônica devido às propriedades quimiotáticas sobre neutrófilos. O objetivo deste estudo foi verificar uma possível associação entre os polimorfismos no gene do sistema de grupo sanguíneo Duffy e os SNPs -353T/A, -845T/C, -738T/A na região promotora do gene *IL8* com a suscetibilidade à periodontite crônica. **Métodos:** Para tanto, 124 indivíduos com a doença e 187 controles que procuraram atendimento em Clínicas Odontológicas de Instituições de Ensino, em Maringá, PR, foram selecionados. O DNA foi extraído pela metodologia de *salting out*. As genotipagens de Duffy e dos polimorfismos na região promotora do gene *IL8* foram realizadas por PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length*). As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de qui quadrado com correção de Yates ou Teste Exato de Fisher e a possibilidade de associação foi avaliada por odds ratio com intervalo de confiança de 95%. **Resultados:** Em indivíduos não fumantes o alelo -845C, o genótipo -845TC e o haplótipo CTA estiveram associados positivamente com a periodontite crônica (alelo-845C: 3,6% vs. 0,4%; OR=10,4; IC95%=1,1-95,6; genótipo-845TC: 7,3% vs. 0,7%; OR=10,1; IC95%=1,1-91,2; haplótipo CTA: 3,6% vs. 0,4%; OR=10,1; IC95%=1,3-259,8). Pacientes afro-brasileiros que apresentavam o SNP-67T>C na região 5' não traduzida do gene *FY*, em homozigose ou heterozigose, concomitantemente com o SNP *IL8* -353A, exibiram resistência à periodontite crônica ($p=0,032$; OR=0,25; IC95%= 0,078- 0,79); e os indivíduos mulatos (mistura de caucasianos e afrodescendentes), com os SNPs -67T>C e/ou 265C>T, em homozigose ou heterozigose, associadas com o SNP *IL8* -353T, apresentaram suscetibilidade à doença ($p=0,042$; OR=2,57; IC 95%= 1,105-5,98). **Conclusão:** A expressão de DARC eritroide e do SNP -353T>C no gene *IL8* podem estar associados com a periodontite crônica: IL-8 livre no plasma liga-se a neutrófilos assim dessensibilizando-os e evitando a sua migração para o foco da infecção e conseqüentemente minimizando lesões teciduais.

Palavras chaves: Antígenos de grupos sanguíneos; Sistema de grupo sanguíneo Duffy; Interleucina-8; Periodontite; Estudos de associação Genética; Receptor de quimiocina.

Association between the Duffy blood group system genes polymorphisms and the regulatory region of *IL8* in chronic periodontitis

ABSTRACT

Background: The antigens of the Duffy blood group system, also known as Duffy antigen receptor for chemokines (DARC), act as a receptor for the interleukin-8 (IL-8) chemokine. IL-8 plays an important role in the pathogenesis of chronic periodontitis due to its chemotactic properties on neutrophils. The aim of this study was to investigate a possible association of the Duffy blood group gene polymorphisms and the -353T/A, -845T/C, -738T/A SNPs in the promoter region of the *IL8* gene in the chronic periodontitis. **Methods:** One hundred and twenty-four individuals with chronic periodontitis and 187 controls treated in dental clinics of teaching institutions in Maringa, Brazil, were enrolled in this study. DNA was extracted by the salting-out method. The Duffy genotypes and polymorphisms in the promoter region of the *IL8* gene were investigated by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Statistical analyses were conducted using the Chi square test with Yates correction or Fisher's Exact Test with the possibility of associations being evaluated by odds ratio with a 95% confidence interval. **Results:** In nonsmokers, the -845C allele (3.6% vs 0.4%; OR = 10.4; CI95%=1.1-95.6), -845T/C genotype (7.3% vs 0.7%; OR = 10.1; CI95%=1.1-91.2) and the CTA haplotype (3.6% vs 0.4%; OR = 10.1; CI95%=1.3-259.8) were positively associated with chronic periodontitis. Afro-Brazilians patients who were homozygous or heterozygous for the -67T>C SNP in the 5' untranslated region of the *FY* gene together with the -353A SNP of the *IL8* gene exhibited resistance to chronic periodontitis (p-value 0.032; OR = 0.25). Moreover, Mulattos (Afro and Caucasians mixed Brazilians) patients with the -67T>C or -265C>T SNPs associated with the -353T allele of the *IL8* gene showed susceptibility for the disease (p-value 0.042; OR = 2.57; CI 95%= 1.105-5.98). **Conclusion:** DARC erythroid expression and *IL8*-353T>A SNP could be associated with periodontitis: IL-8 free in the plasma binds to neutrophils thus desensitizing them and preventing their migration to the focus of infection and minimizing tissues lesions.

Keywords: Blood group antigens; Duffy blood-group system; Interleukin-8; Periodontitis; Genetic association studies; Chemokine receptors.

Introdução

O sistema de grupo sanguíneo Duffy é composto por cinco antígenos transportados em uma glicoproteína de membrana multipasso chamada de DARC (*Duffy antigen receptor chemokines*) [1-3]. Esses antígenos estão presentes nos eritrócitos e células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares em diversos tecidos, exceto no córtex cerebelar, onde a expressão Duffy está localizada nas células de Purkinje [4].

Além de ser ligante de parasitas da malária, *Plasmodium vivax* e *knowlesi* [5], vírus HIV-1 [6] e moléculas como Tetraspanin CD82 [7], DARC é também um receptor de alta afinidade para quimiocinas pró-inflamatórias da classe CXC, como a IL-8, e CC, que incluem MCP-1 (Proteína Quimiotática de monócito do tipo 1), MIP (proteína inflamatória de macrófago do tipo 1) e RANTES (citocina regulada por ativação expressada e secretada por linfócitos T normais) [8]. Ao contrário do receptor típico de quimiocinas, DARC não ativa a cascata de sinalização intracelular acoplada à proteína G, um acontecimento chave na sinalização da migração celular, porque não possui o motivo de Asp-Arg-Tyr (DRY) altamente conservado na segunda alça intracelular da proteína, e por isso é considerado um receptor silencioso [9,10].

Os principais antígenos do Sistema de Grupo sanguíneo Duffy, Fy^a e Fy^b, são codificados por duas formas alélicas do gene *FY*, os alelos *FY*01* e *FY*02* [11], respectivamente, que diferem por uma simples substituição de base no nucleotídeo 125. Essa substituição de um aminoácido no domínio aminoterminal da proteína não afeta a afinidade de ligação de quimiocinas [12]. A maioria dos indivíduos oeste-africanos e dois terços dos afro-americanos não expressam Fy^a ou Fy^b na superfície dos eritrócitos, apresentando o fenótipo Fy(a-b-) devido à uma troca de base nucleotídica em homozigose na região 5' não traduzida do gene *FY*, -67T>C, também chamada de mutação GATA-1. O genótipo encontrado nestes indivíduos é *FY*02N.01/FY*02N.01* [11,13-15]. O alelo raro *FY*02M.01*, característico de

caucasianos, codifica uma fraca expressão do antígeno Fy^b nos eritrócitos devido à dois polimorfismos no éxon 2 do gene *FY* (265C>T e 298G>A) [16]. No Brasil devido à mistura entre europeus, afro-brasileiros e/ou índios brasileiros, estes polimorfismos também são encontrados em outros grupos étnicos [17].

Estudos recentes mostram que a adsorção de IL-8 nos eritrócitos pelos antígenos do sistema de grupo sanguíneo Duffy levam a um maior recrutamento de leucócitos do sangue para o tecido quando comparado com a ausência de DARC eritroide. Isso ocorre porque DARC eritroide remove as quimiocinas plasmáticas "dessensibilizantes" (IL-8 livre na circulação liga à neutrófilos e impedem a sua quimiotaxia) e, indiretamente, melhora o sinal de codificação de IL-8 na superfície das células endoteliais (via imobilização por glicosaminoglicanas) aos sítios predestinados para o recrutamento de neutrófilos [18].

Devido às suas propriedades quimiotáticas sobre neutrófilos, a IL-8 tem um papel importante na patogênese na periodontite crônica [19], uma doença caracterizada por um processo inflamatório destrutivo que afeta os tecidos de suporte e proteção do dente. Assim, o estudo de polimorfismos no gene *FY*, que possam levar a menor expressão ou até mesmo a ausência de expressão DARC eritroide, juntamente com polimorfismos que influenciam na produção de IL-8 poderão auxiliar no entendimento da imunopatogênese da periodontite crônica.

Métodos

Seleção da amostra

Este estudo envolveu indivíduos da região norte e noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil. Um total de 311 indivíduos foram selecionados dentre os que buscaram atendimento odontológico nas Clínicas Odontológicas da Universidade Estadual de Maringá–UEM e Faculdade Ingá–UNINGÁ, no período de dezembro/2011 a setembro/2012. Participaram deste

estudo indivíduos acima de 18 anos, de ambos os sexos, de todo grupo étnico e, com no mínimo, 20 dentes na cavidade bucal. Indivíduos com quadro de infecção aguda, gravidez ou lactação não foram incluídos. Todos os indivíduos que aceitaram participar desta pesquisa foram informados sobre os propósitos do estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá–UEM (Parecer nº 719/2011, 02/12/2011).

Após a anamnese, os exames clínicos periodontais foram realizados por dois examinadores. Os parâmetros clínicos de profundidade de sondagem e nível de inserção clínica (NIC) foram examinados em seis sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual) de cada dente, além de sangramento à sondagem. Após o exame periodontal, os indivíduos foram classificados em dois diferentes grupos: grupo com periodontite crônica (N=124), composto por indivíduos que apresentaram pelo menos 5 sítios em diferentes dentes com a presença de bolsas periodontais maiores ou iguais a 5 mm e perda de inserção maiores ou iguais a 3mm; grupo controle (N=187), formado por indivíduos que não apresentaram sítios com perda de inserção, profundidade de sondagem menores que 4mm e sem sangramento à sondagem.

Informações sobre o grupo étnico e o hábito de fumar foram obtidas através de questionamento individual.

Coleta de amostra e extração de DNA

Para extração do DNA, o buffy coat foi obtido após centrifugação (210g/15 min) de 4 mL de sangue periférico, coletados em tubos com EDTA. O DNA foi extraído pelo método de *Salting out*. A concentração e qualidade de todos os DNAs preparados foram analisadas por densidade óptica em Thermo Scientific NanoDrop 2000[®], Wilmington, USA.

PCR-RFLP para genotipagem do sistema de grupo sanguíneo Duffy

As genotipagens foram realizadas conforme proposto por Castilho e cols. (2004) [20] com adaptações.

Para a reação de PCR foram usados 100 ng de DNA, 50 pmol de cada *primer* (Invitrogen, Frederick, MD, USA), 0,2mM de cada dNTP (Invitrogen), 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) 2mM de MgCl₂ e tampão (PCR Amplification Buffer, Invitrogen) em um volume final de 50 µL.

A região promotora foi amplificada utilizando-se os *primers* FYN1 sense e FYN2 reverse que flanqueiam a região GATA-1. Para a determinação dos outros polimorfismos de Duffy eritroide, utilizou-se os *primers* FYAB1 sense e FYAB2 reverse que flanqueiam um segmento de 392 pb no éxon 2 do gene *FY* [20]. A sequência amplificada pelo conjunto de *primers* FYAB1/FYAB2 incluiu os SNPs 125 G>A (um sítio para o polimorfismo *FY*01/FY*02*), 265C>T e 298 G>A (sítios para *FY*02M.01*). Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador Perkin Elmer 9700 (Foster City, CA, EUA). O mesmo protocolo de amplificação foi utilizado para as duas reações: desnaturação a 95°C por 15 minutos; 35 ciclos de 20 segundos a 94°C; 20 segundos a 62°C; 20 segundos a 72°C e uma extensão de 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR amplificados foram digeridos, *overnight*, com as enzimas de restrição apropriadas (New England Biolabs®, Beverly, MA e MBI Fermentas®, Amherst, NY), em um volume final de 20 µL, utilizando-se 10 µL do produto de PCR e 10 µL da mistura de enzima/tampão, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A análise do tamanho dos fragmentos obtidos com a digestão enzimática foi realizada após eletroforese em gel de agarose 2 à 3,5% e corados com SYBR Green (Invitrogen).

Análise dos polimorfismos genéticos na região promotora do gene da Interleucina-8

Os polimorfismos na região promotora de *IL8* foram investigados por PCR-RFLP: SNPs -845T>C e -353T>A por protocolo adaptado de Rovin e cols. (2002) [21] e -738T>A de Heinzmann e cols. (2004) [22] e Lee e cols. (2006) [23].

As reações de PCR para os SNPS -845T>C e -353T>A foram realizadas em volume final de 50 µL contendo Tampão 1,0 X (PCR Amplification Buffer- Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 0,2 µM de cada *primer* (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 200 ng de DNA genômico.

A PCR para o SNP -738T>A foi realizada em um volume final de 25 µl, contendo Tampão 1,0 X (PCR Amplification Buffer), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer, 1U of Taq DNA polymerase e 50 ng de DNA genômico. Os *primers* e as condições de ciclagem estão descritos na Tabela 1. Os produtos de PCR amplificados foram digeridos, overnight, com as enzimas de restrição apropriadas (New England Biolabs e MBI Fermentas®), em um volume final de 20 µL, utilizando-se 10 µL do produto de PCR e 10 µL da mistura de enzima/tampão, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A análise do tamanho dos fragmentos obtidos com a digestão enzimática foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com SYBR Green (Invitrogen).

Tabela 1. PCR-RFLP: *primers*, ciclos e enzimas utilizados na definição dos polimorfismos na região promotora de *IL8*.

SNP	Sequência de <i>primer</i> (GenBank M28130)	Condições de ciclagem	Enzima de restrição	Fragmentos após digestão enzimática
-845 (T/C)	s -GAATTCAGTAACCCAGGCAT r- AAGCTTGTGTGCTCTGCTGTC	95 °C, 3min; 35 ciclos (95°C 45 s; 56°C, 30s; 68°C, 2 min) e 68°C, 8 min.	AseI	791 + 736 (T) 1527 (C)
-353 (T/A)	s-GAATTCAGTAACCCAGGCAT r-AAGCTTGTGTGCTCTGCTGTC	95 °C, 3min; 35 ciclos (95°C, 45 s; 56°C, 30s; 68°C, 2 min) e 68°C, 8 min.	MfeI	1230 +297 (A) 1527 (T)
-738 (T/A)	s-AACCCAGCAGCTCCAGTG r-AGATAAGCCAGCCAATCATT	94°C, 5 min; 35 ciclos (94°C, 30 s; 61°C, 1 min; 72°C, 1 min) e 72°C, 8 min.	XbaI	302 + 232 (T) 534 (A)

s:sense, r: reverse, pb: pares de base

Análise Estatística

As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta. Para avaliar se a estimativa da distribuição genotípica entre as frequências observadas e esperadas encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o programa ARLEQUIN versão 3.1. [24]. O mesmo programa foi utilizado para investigar o desequilíbrio de ligação e as frequências estimadas dos possíveis haplótipos de *IL8*. A associação entre polimorfismos genéticos e periodontite crônica foi avaliada pelo Teste de qui-quadrado com correção de Yates ou Teste Exato de Fisher para $n < 5$ e *odds ratio* com intervalo de confiança de 95% para um valor de *p* significativo usando o programa OpenEpi Versão 2.3.1.[25]. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%.

Resultados

A população estudada compreendeu 311 indivíduos não aparentados, entre eles 124 pacientes com periodontite crônica e 187 controles. A maioria dos participantes eram principalmente do sexo feminino (60,5%), não fumantes (60,8) e Caucasianos (64,3%) (Tabela

2). A Diabetes foi significativamente mais frequente em pacientes do que em controles confirmando ser um fator de suscetibilidade à periodontite crônica ($p<0,001$; OR=3,313; 95% IC=1,883-5,882). O tabaco também foi fator de risco importante: indivíduos fumantes e ex-fumantes têm entre 2 a 3 vezes mais chances de desenvolver periodontite crônica do que indivíduos não fumantes (Tabela 2). A distribuição dos genótipos de cada SNP estudado encontrou-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 2. Características da população controle e de pacientes com periodontite crônica.

		Controle N=187	Periodontite N=124	Total
Gênero	Feminino	120 (64,2%)	68 (54,84%)	188 (60,5%)
	Masculino	67 (35,8%)	56 (45,16%)	123 (39,5%)
Idade	18 a 33 anos	35 (18,72%)	16 (12,90%)	51 (16,4)
	34 a 49 anos	98 (52,41%)	65 (52,42%)	163 (52,4%)
	50 a 65 anos	50 (26,74%)	35 (28,23%)	85 (27,3%)
	66 a 81 anos	4 (2,14%)	8 (6,45%)	12 (3,9%)
Grupo étnico	Caucasianos	128 (68,45%)	72 (58,06%)	200 (64,3%)
	Afro-brasileiros	14 (7,49%)	15 (12,10%)	29 (9,3%)
	Mulato	45 (24,06)	17 (13,71%)	82 (26,3)
Tabaco	Não fumante *	134 (71,66)	55 (44,35%)	189 (60,8%)
	Fumante **	23 (12,30%)	28 (22,58%)	51 (16,40%)
	Ex-fumante ***	30 (16,04%)	41 (33,06%)	71 (22,8)
Diabetes	Não ****	180 (96,26%)	109 (87,90%)	289 (92,9%)
	Sim	7 (3,74%)	15 (12,10%)	22 (7,1%)

* $p<0,001$; OR=0,31; 95% IC=0,19-0,50; ** $p=0,03$; OR=2,07; 95% IC=1,12-3,84;

*** $p<0,001$; OR=2,95; 95% IC=1,56-5,62; **** $p<0,001$; OR=3,31; 95% IC=1,88-5,88.

A fim de excluir o hábito de fumar como um fator de predisposição, as análises estatísticas foram realizadas na amostra total (indivíduos fumantes e não fumantes), como também em indivíduos não fumantes. Para o sistema de grupo sanguíneo Duffy, o genótipo prevalente em todos nos grupos analisados foi *FY*01/FY*02* e o alelo *FY*02* foi o mais frequente (Tabela 3). Diferenças nas frequências genótípicas e alélicas não foram observadas entre todos os grupos analisados.

Tabela 3. Distribuição dos genótipos e alelos do Sistema de Grupo Sanguíneo Duffy em pacientes com periodontite crônica e controles.

Duffy	Total		Não fumantes	
	Periodontite N=124	Controle N=187	Periodontite N=55	Controle N=134
Genótipos	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>FY*01/FY*01</i>	10 (8,1)	27 (14,4)	10 (18,1)	23 (17,2)
<i>FY*01/FY*02</i>	45 (36,3)	62 (33,2)	15 (27,3)	41 (30,6)
<i>FY*02/FY*02</i>	33 (26,6)	57 (30,5)	13 (23,6)	40 (29,9)
<i>FY*02/FY*02N.01</i>	10 (8,1)	12 (6,4)	4 (7,3)	9 (6,7)
<i>FY*02/FY*02M.01</i>	2 (1,6)	3 (1,6)	1 (1,8)	2 (1,5)
<i>FY*01/FY*02N.01</i>	12 (9,7)	10 (5,3)	6 (11)	8 (6)
<i>FY*02N.01/FY*02N.01</i>	7 (5,6)	11 (5,9)	3 (5,5)	9 (6,7)
<i>FY*02M.01/FY*02N.01</i>	2 (1,6)	3 (1,6)	1 (1,8)	1 (0,7)
<i>FY*01/FY*02M.01</i>	3 (2,4)	2 (1,1)	2 (3,6)	1 (0,7)
Alelos				
<i>FY*01</i>	80 (32,3)	128 (34,2)	43 (39,1)	96 (35,8)
<i>FY*02</i>	123 (49,6)	191 (51,1)	46 (41,8)	132 (49,3)
<i>FY*02N.01</i>	38 (15,3)	47 (12,6)	17 (15,5)	36 (13,4)
<i>FY*02M.01</i>	7 (2,8)	8 (2,1)	4 (3,6)	4 (1,5)

As frequências alélicas e genotípicas dos SNPs -845T>C, -738T>A e -353T>A na região promotora do gene *IL8* estão reunidas na Tabela 4. Em pacientes não fumantes com periodontite crônica o alelo -845C foi mais frequente em relação aos controles (3,6% vs. 0,4%; $p=0,05$; OR=10,4; IC95%=1,1-95,6), assim como o genótipo -845TC (7,3% vs. 0,7% $p=0,05$; OR=10,1; IC95%=1,1-91,2) e o haplótipo CTA (3,6% vs. 0,4%; $p=0,04$; OR=10,3; IC95%=1,3-259,8) indicando correlação positiva. Além disso, o genótipo CTA/TTT esteve presente somente em pacientes com periodontite (5% vs. 0%; $p=0,05$; dados não apresentados).

Tabela 4. Frequência alélica, genotípica e haplotípica dos polimorfismos -845T>C, -738T>A -353T>A na região promotora do gene *IL8* em pacientes com periodontite e no grupo controle.

SNP <i>IL8</i>	Total		Não fumantes	
	Periodontite N=124(%)	Controles N=187(%)	Periodontite N=55(%)	Controles N=134(%)
-845				
T	240 (96,8)	370 (98,9)	106 (96,4)	267 (99,6)
C	8 (3,2)	4 (1,1)	4 (3,6)	1 (0,4)
TT	117 (94,4)	183 (97,9)	51 (92,7)	133 (99,3)
TC	6 (4,8)	4 (2,1)	4 (7,3)	1 (0,7)
CC	1 (0,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
-738				
T	247 (99,6)	373 (99,7)	109 (99,1)	267 (99,6)
A	1 (0,4)	1 (0,3)	1 (0,9)	1 (0,4)
TT	123 (99,2)	186 (99,5)	54 (98,2)	133 (99,3)
TA	1 (0,8)	1 (0,5)	1 (1,8)	1 (0,7)
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
-353				
T	130 (52,4)	198 (52,9)	63 (57,3)	145 (54,1)
A	118 (47,6)	176 (47,1)	47 (42,7)	123 (45,9)
TT	34 (27,4)	53 (28,3)	17 (30,9)	38 (28,4)
TA	62 (50)	92 (49,2)	29 (52,7)	69 (51,5)
AA	28 (22,6)	42 (22,5)	9 (16,4)	27 (20,1)
-845 -738 -353				
TTT	131 (52,8)	198 (53)	63 (57,3)	145 (54,1)
TTA	108 (43,6)	171 (45,7)	42 (38,2)	121 (45,1)
TAA	1 (0,4)	1 (0,3)	1 (0,9)	1 (0,4)
CTA	8 (3,2)	4 (1,0)	4 (3,6)	1 (0,4)

^a p=0.05; OR=0.1; CI95%=0.01- 0.9; ^b p=0.05; OR=10.4; CI95%=1.1-95,6; ^c p=0.05; OR=0.1; CI95%=0.01- 0.9;

^d p=0.05; OR=10.1; CI95%=1.1-91,2; ^e p=0.05; OR=10.1; CI95%=1.1-91,2

A fim de avaliar a expressão de DARC na superfície do eritrócito, dois novos grupos foram formados: o primeiro, denominado *sem polimorfismo*, foi formado pela somatória das frequências alélicas de *FY*01* e *FY*02*, que codificam a expressão Fy^a e Fy^b , respectivamente, e o outro, denominado *com polimorfismo*, foi constituído pela soma das frequências dos alelos *FY* com o SNP-67T>C, alelos *FY*02N.01*, e do SNP 265T>C, alelos *FY*02M.01*. Como as frequências dos polimorfismos diferem nos grupos étnicos, as análises foram realizadas separadamente para cada grupo étnico. Os resultados estão reunidos na Tabela 5.

Para o grupo étnico formado por caucasianos, a distribuição das frequências dos alelos de *FY sem polimorfismo* e *FY com polimorfismo* foram semelhantes entre pacientes e controles.

Em indivíduos afro-brasileiros e mulatos, diferenças foram observadas, embora não significantes estatisticamente. Os pacientes afro-brasileiros com periodontite crônica apresentaram menor frequência de alelos *FY com polimorfismo* (33,3% vs. 57,2%) e os pacientes mulatos, ao contrário, apresentaram maior frequência destes alelos (29,8% vs. 16,65%).

Tabela 5. Distribuição das frequências de alelos *FY* com presença e ausência dos SNPs 265T>C e -67T>C em pacientes com periodontite crônica e controles.

Duffy	Periodontite	Controle
	n (%)	n (%)
Caucasianos	N=72	N=128
<i>FY*01 e FY*02</i>	131 (91)	232 (90,7)
<i>FY*02N.01 e FY*02M.01</i>	13 (9,0)	24 (9,3)
Afro-brasileiros	N=15	N=14
<i>FY*01 e FY*02</i>	20 (66,7)	12 (42,8)
<i>FY*02N.01</i>	10 (33,3)	16 (57,2)
Mulatos	N=37	N=45
<i>FY*01 e FY*02</i>	52(70,2)	75(83,35)
<i>FY*02N.01 e FY*02M.01</i>	22(29,8)	15(16,65)

As frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos -845T>C, -738T>A e -353T>A de *IL8* foram analisadas separadamente em pacientes com periodontite e controles afro-brasileiros e mulatos (Tabela 6). A frequência do SNP -353A foi menor em pacientes do que em controles afro-brasileiros (40% vs.60%), e mulatos (47.3% vs 50%); embora sem significância estatística. Em afro-brasileiros, o haplótipo TTA esteve em menor frequência em pacientes com periodontite do que em controles (33,3% vs. 60,7 %; $p=0,067$; OR=0,3; IC95%=0,1-0,9).

Tabela 6. Frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas dos polimorfismos -845T>C, -738T>A e -353T>A na região promotora de *IL8* em pacientes e controles do grupo étnico afro-brasileiros e mulatos.

SNP	Afro-brasileiros		Mulatos	
	Periodontite N=15	Controles N=14	Periodontite N=37	Controles N=45
-845				
T	28 (93,3)	28 (100)	70 (94,6)	88 (97,8)
C	2 (6,7)	0 (0)	4 (5,4)	2 (2,2)
TT	13 (86,7)	14 (100)	35 (94,5)	43 (95,6)
TC	2 (13,3)	0 (0)	2 (5,4)	2 (94,4)
CC	0 (0)	0(0)	0	0
-738				
T	30 (100)	28 (100)	74 (100)	90 (100)
A	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TT	15 (100)	14 (100)	37 (100)	45 (100)
TA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0(0)
-353				
T	18 (60)	11 (39,3)	39 (52,7)	45 (50)
A	12 (40)	17 (60,7)	35 (47,3)	45 (50)
TT	5 (33,33)	3 (21,4)	9 (24,3)	10 (22,2)
TA	8 (53,33)	5 (35,7)	21 (56,8)	25 (55,6)
AA	2 (13,33)	6 (42,9)	7(18,9)	10 (22,2)
-845 -738 - 353				
TTT	18 (60)	11 (39,3)	39 (52,7)	45 (50)
TTA	10 (33,3)*	17 (60,7)*	33 (44,6)	43 (47,8)
CTA	2 (6,7)	0	2 (2,7)	2 (2,2)

* $p = 0,067$; OR=0,3; IC 95%=0,1- 0,9.

A análise conjunta dos genótipos *FY com e sem polimorfismo versus* o polimorfismo *IL8 -353T>A* foi realizada em pacientes e controles (Tabela 7). Em afro-brasileiros, a frequência do genótipo *FY com polimorfismo + SNP-353A* foi menor em pacientes com periodontite (20% vs 50%; $p=0,032$; OR=0,25; IC95%=0,078-0,79). Nos indivíduos mulatos a presença simultânea do genótipo *FY com polimorfismo + SNP -353T* foi mais frequente em pacientes com periodontite crônica do que em controles (24,3% vs. 11,1%; $p=0,04$; OR=2,57; IC95%=1,105-5,98).

Tabela 7. Distribuição de genótipos *FY* com presença e ausência dos polimorfismos -67T>C e/ou 265T>C *versus* o SNP *IL8* -353T>A, em pacientes com periodontite crônica e controles.

Genótipos Duffy	Periodontite <i>IL8</i> -353					Controles <i>IL8</i> -353				
	TT	TA	AA	A	T	TT	TA	AA	A	T
Total	N=124					N=187				
<i>Sem polimorfismo^a</i>	24(19,4)	42(33,9)	22(17,7)	86(34,7)	90 (36,3)	43(23)	72(38,5)	31(16,6)	134(35,8)	158(42,2)
<i>Com polimorfismo^b</i>	10(8)	20(16,1)	6(4,8)	32(12,9)	40(16)	10(5,34)	21(11,22)	10(5,34)	41(11)	41(11)
Caucasianos	N=72					N=128				
<i>Sem polimorfismo</i>	17(23,6)	25(34,7)	17(23,6)	59(41)	59(41)	33(25,8)	52(40,6)	23(18)	98(38,3)	118(46)
<i>Com polimorfismo</i>	3(4,2)	8(11,1)	2(2,8)	12(8,3)	14(9,7)	7(5,5)	10(7,8)	3(2,3)	16(6,3)	24(9,4)
Afro-brasileiros	N=15					N=14				
<i>Sem polimorfismo</i>	3(20)	4(26,7)	1(6,7)	6(20)	10(33,33)	2(14,2)	1(7,1)	1(7,11)	3(10,7)	5(17,9)
<i>Com polimorfismo</i>	2(13,33)	4(26,7)	1(6,7)	6(20) ^c	8(26,7)	1(7,1)	4(28,6)	5(35,7)	14 (50) ^c	6(21,4)
Mulatos	N=37					N=45				
<i>Sem polimorfismo</i>	4(10,81)	13(35,13)	4(10,81)	21(28,4)	21(28,4)	8(17,8)	19(42,2)	7(15,6)	33(36,7)	35(38,9)
<i>Com polimorfismo</i>	5(13,51)	8(21,62)	3(8,1)	14(18,9)	18(24,3) ^d	2(4,4)	6(13,3)	3(6,7)	12(13,3)	10(11,1) ^d

^a Genótipos *FY* com ausência dos SNPs -67T>C e/ou 265T>C;

^b Genótipos *FY* com presença dos SNPs -67T>C e/ou 265T>C em homozigose ou heterozigose;

^c $p= 0,032$; OR= 0,25; IC95%= 0,078- 0,79;

^d $p= 0,042$; OR= 2,57; IC 95%= 1,105-5,98.

Discussão

O sistema de grupo sanguíneo Duffy foi identificado como um receptor para IL-8, uma quimiocina inflamatória envolvida na ativação e tráfico de neutrófilos [10, 26-28]. Quando a IL-8 está ligada à DARC eritroide ela é efetivamente inativada. Eritrócitos de pessoas com o fenótipo Fy(a-b-) não ligam IL-8, e portanto não possuem esta função de escoadouro proposta para DARC eritroide [10, 27]. Como altos níveis de IL-8 sérica e de neutrófilos estão envolvidos na patogênese da periodontite crônica [29], foi estudado um possível papel de DARC neste contexto.

Vários fatores de risco de doenças periodontais têm sido identificados [30,31], incluindo a diabetes, um forte fator de risco causal para a patologia periodontal [32,33,34,35]. No presente estudo, indivíduos com diabetes apresentaram três vezes mais chances de desenvolver a periodontite crônica do que indivíduos não diabéticos ($p<0,001$; OR=3,313; 95% IC=1,883-5,882). A plausibilidade biológica tem sido bem documentada, e a melhor evidência sugere que a influência potencial de diabetes sobre a doença periodontal é provavelmente explicada por uma resposta hiperinflamatória à infecção, um desacoplamento da destruição óssea e reparação, e/ou por efeitos dos produtos de glicação avançada [35,36].

O fumo é outro fator de risco importante para o início e progressão da periodontite crônica [37-39]. O presente estudo confirmou esses achados (Tabela 2). Mecanismos potenciais para o efeito do fumo na doença periodontal inclui a imunossupressão e a exacerbada resposta celular inflamatória [40]. O risco relacionado ao tabagismo pode muitas vezes obscurecer os fatores de risco genéticos [41]. Por isso, a análise estatística do subgrupo de não fumantes foi realizada para excluir uma possível influência do fumo sobre os fatores genéticos.

A distribuição dos alelos e genótipos *FY* e da maioria dos polimorfismos *IL8* -845T>C, -738T>A, -353T>A foram semelhantes entre pacientes com periodontite crônica e

controles (população total e de não fumantes) (Tabelas 3 e 4). A exceção refere-se ao polimorfismo *IL8*-845T>C em não fumantes: o alelo -845C e o genótipo -845TC foram associados com a suscetibilidade à periodontite crônica (alelo -845C:3,6% vs. 0,4%; OR=10,4; genótipo -845TC: 7,3% vs. 0,7%; OR=10,1). Assim, indivíduos que têm o alelo -845C ou o genótipo -845TC possuem 10 vezes mais chances de desenvolver a doença do que aquelas que não possuem. Até onde sabemos, os polimorfismos *IL8* -845T>C e -738T>A não estão relacionados com diferentes níveis de produção desta citocina e estes SNPs estão correlacionados a poucos estudos de associação com doenças [21, 42, 43], possivelmente, devido a baixa diversidade genética: os alelos mutantes C e A foram observados somente em populações americanas africanas (C: 8% e A: 5% [21]) e ausentes em Europeus [21,42].

Kim e cols. (2010) [42] estudaram a associação dos polimorfismos *IL8*-845T>C, -738T>A, -353T>A na periodontite crônica, em uma população brasileira, e não observaram associação entre os alelos e os genótipos na amostra total e em não fumantes. Entretanto na análise haplotípica obtiveram resultados significativos para os haplótipos CTA, TTA e TAT, que foram associados com a suscetibilidade à periodontite na amostra total e em não fumantes. No presente estudo, o haplótipo CTA também esteve relacionado à suscetibilidade à doença (Tabela 4), entretanto, o haplótipo TAT não foi encontrado, porque a frequência do alelo -738A em nossa população foi muito baixa (<1%) e o genótipo CTA/TTT foi encontrado somente em indivíduos com periodontite crônica (5% vs 0%; $p=0,05$; dados não mostrados).

O SNP *IL8*-353T>A, também encontrado na literatura como -251T>A e rs4073T>A foi associado a elevados níveis de transcritos de *IL-8*, após a estimulação do sangue total com lipopolissacarídeos [44]. Este polimorfismo foi descrito na literatura associado a várias doenças: bronquiolite por vírus sincicial respiratório, câncer de próstata, câncer gástrico distal, câncer de mama, carcinoma de células orais escamosas, degeneração macular associada

à idade, líquen plano oral [44-49]. Estudos de associação do SNP *IL8* -353T>A com a periodontite crônica, no Brasil, foram realizados anteriormente por Kim e cols. em 2009 [50] e Andia e cols. em 2011[51]. Kim e cols. avaliaram dois grupos separadamente: a amostra total composta de indivíduos fumantes e não fumantes, e o grupo formado somente por indivíduos não fumantes, e não encontraram associação do SNP -353T>A com a periodontite crônica. Andia e cols., estudando somente indivíduos não fumantes, verificaram redução da frequência do genótipo TT (35,2% no grupo de controle *versus* 13,8% no grupo periodontite) e aumento significativo da frequência do genótipo TA (52,8% no grupo de controle *versus* 74,6% no grupo periodontite) na periodontite. A suscetibilidade do genótipo TA também foi verificada quando os indivíduos caucasianos foram analisados separadamente. Inclusive altos níveis de RNAm de IL-8 foi encontrado em indivíduos com o genótipo TA. As diferenças destes resultados podem estar relacionadas à seleção dos grupos (fumantes e ou não fumantes) e a diferenças na composição da população, uma vez que a população brasileira é altamente miscigenada. Segundo Ioannidis e cols. (2001) [52], as associações genéticas podem não ser uniformes em toda população e a frequência de ocorrência dos polimorfismos podem variar entre grupos étnicos.

O grupo étnico é um fator importante a ser considerado, porque as frequências de muitos alelos variam entre os diferentes grupos étnicos. Muitos estudos têm revelado resultados contraditórios quando são feitas comparações entre populações distintas [53-55]. Por isso, subdividiu-se a amostra com relação aos grupos étnicos.

Quando foi avaliada a expressão de DARC na superfície do eritrócito nos grupos *sem polimorfismo* e *com polimorfismo* nos diferentes grupos étnicos (caucasianos, afro-brasileiros e mulatos) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Tabela 5), embora houvesse uma diminuição do SNP -67T>C (alelo *FY*02N.01*) em pacientes afro-brasileiros (33% *vs.* 57,2%).

O SNP -67T>C na região 5' não traduzida do gene *FY* resulta na ausência de expressão do antígeno Fy^b apenas no eritrócito, fenótipo Fy (b-), não alterando a expressão dessa proteína nos outros tecidos [13]. Este polimorfismo é altamente frequente em afrodescendentes, aproximadamente 67% dos afro-brasileiros possuem o fenótipo Fy(a-b-) [56]. No presente trabalho, observou-se que a frequência do alelo *FY*02N.01* foi menor do que o esperado para este grupo étnico, em pacientes com periodontite, apesar de estatisticamente não ser estatisticamente significativo. Acredita-se que a análise de um número maior de indivíduos afro-brasileiros possa propiciar conclusões mais claras com relação ao SNP -67T>C e a periodontite crônica neste grupo étnico.

A análise dos SNPs *IL8* -845T>C, -738T>A, -353T>A no grupo étnico formado por afro-brasileiros não revelou diferença estatística significativa nas frequências alélicas e genóticas para controles e pacientes. O alelo C do SNP -845 foi raramente encontrado, e o alelo A do SNP -738 não foi encontrado em afro-brasileiros e mulatos (Tabela 6). Entretanto o haplótipo TTA foi um haplótipo com tendência à proteção em afro-brasileiros, com um valor de *p* tendendo à significância estatística (*p*=0,067; OR=0,3; IC95%=0,1-0,9) (Tabela 7). Ao contrário, Kim e cols. (2010) [42] verificaram que TTA é um haplótipo de suscetibilidade à doença periodontal, entretanto, a população analisada em seu trabalho, não foi categorizada de acordo com o grupo étnico, foi uma população mista.

Quando realizada a análise conjunta dos genótipos *FY* com e sem polimorfismo versus o polimorfismo *IL8*-353T>A (Tabela 7) na população de caucasianos, não observou-se diferenças estatísticas significantes. No entanto, afro-brasileiros que possuem o SNP -67T>C na região 5' não traduzida do gene *FY*, em homozigose ou heterozigose, e possuem também o SNP *IL8* -353A (alto produtor de IL-8) são resistentes à periodontite crônica (*p*=0,032; OR=0,25 IC95%=0,078-0,79). Em indivíduos mulatos, o genótipo Duffy com os SNPs -67T>C (ausência de DARC) e/ou 265T>C em homozigose ou heterozigose (baixa expressão

de DARC) associadas com o SNP *IL8* -353T (baixa produção de IL-8), são fatores de suscetibilidade à periodontite crônica ($p=0,042$; OR=2,57; IC95%=1,105-5,98).

Geralmente, uma combinação específica de polimorfismos em diferentes genes, ou a interação entre polimorfismos no gene com os fatores ambientais, podem alterar de forma significativa o risco de um indivíduo desenvolver o fenótipo de certas doenças [57,58]. Assim, com base na teoria de Rot [17] e nos resultados obtidos neste trabalho, a nossa hipótese é de que, em afro-brasileiros, a ausência ou menor expressão de DARC eritroide, associado a maior produção de IL-8 induz a maior quantidade de IL-8 plasmática livre e com capacidade de dessensibilizar os neutrófilos na circulação sanguínea. Dessa forma, a migração dos neutrófilos para o foco inflamatório é menor, e a menor concentração de neutrófilos no tecido periodontal e a menor taxa de liberação de enzimas proteolíticas protegem o tecido da lesão. No grupo étnico de mulatos, a ausência ou baixa expressão de DARC, associada à baixa produção de IL-8, faz com que ocorram níveis diminuídos de IL-8 plasmática livre, assim os polimorfonucleares serão menos dessensibilizados e a ativação de neutrófilos via GAG é melhorada, desta forma haverá maior transmigração de polimorfonucleares para os tecidos periodontais contribuindo para a lesão e a suscetibilidade à doença periodontal crônica. Assim, o balanço de expressão DARC eritroide e produção IL-8 são fundamentais para proteger ou não a lesão tecidual.

Conclusão

O polimorfismo de DARC eritroide mais o SNP *IL8*-353T>A foi associado com a periodontite crônica, principalmente, em descendentes afro-brasileiros - incluindo mulatos. O balanço da expressão DARC eritroide e produção de IL-8 são fundamentais para proteger ou não da lesão tecidual: IL-8, quando livre no plasma, liga-se aos neutrófilos dessensibilizando-os e impedindo a sua migração para o foco da infecção.

Lista de abreviaturas

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

µL- microlitros

mM- milimolar

U- unidade

ng- nanograma

pb- pares de base

dNTP- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DNA- ácido desoxirribonucleico

mL- mililitro

MgCl₂- Cloreto de Magnésio

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram que não existe conflito de interesse.

Agradecimentos

À CAPES, Fundação Araucária, aos professores, técnicos e acadêmicos do laboratório de Imunogenética LIG-UEM.

Referências

1. Neote K, Mak JY, Kolakowski LF Jr, Schall TJ: **Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor.** *Blood* 1994, **84**(1):44-52.
2. Chaudhuri A, Zbrzezna V, Polyakova J, Pogo AO, Hesselgesser J, Horuk R: **Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor.** *J Biol Chem* 1994, **269**(11):7835-8.
3. Murphy PM: **The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors.** *Annu Rev Immunol* 1994, **12**:593-633.
4. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Pogo AO: **The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals.** *Blood* 1995, **85**(3):615-21.

5. Horuk R, Colby TJ, Darbonne WC, Schall TJ, Neote K: **The human erythrocyte inflammatory peptide (chemokine) receptor. Biochemical characterization, solubilization, and development of a binding assay for the soluble receptor.** *Biochemistry* 1993, **32**(22):5733-8.
6. He W, Neil S, Kulkarni H, Wright E, Agan BK, Marconi VC, Dolan MJ, Weiss RA, Ahuja SK: **Duffy antigen receptor for chemokines mediates transinfection of HIV-1 from red blood cells to target cells and affects HIV-AIDS susceptibility.** *Cell Host Microbe* 2008, **4**(1):52-62.
7. Bandyopadhyay S, Zhan R, Chaudhuri A, Watabe M, Pai SK, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Takano Y, Saito K, Pauza ME, Hayashi S, Wang Y, Mohinta S, Mashimo T, Iizumi M, Furuta E, Watabe K.: **Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression.** *Nat Med* 2006, **12**(8):933-8.
8. Neote K, Darbonne W, Ogez J, Horuk R, Schall TJ: **Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells.** *J Biol Chem* 1993, **268**(17):12247-9.
9. Römpler H, Yu H, Arnold A, Orth A, Schöneberg T: **Functional consequences of naturally occurring DRY motif variants in the mammalian chemoattractant receptor GPR33.** *Genomics* 2006, **87**(6): 724-732.
10. Hadley TJ, Peiper SC: **From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen.** *Blood* 1997, **89**:3077-3091.
11. **ISBT. International Society of Blood Transfusion** [http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and_/008_FY_Alleles_v2.0_110914.pdf] (Acesso em:16/01/2013).
12. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Cartron JP, Colin Y: **Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/Fyb blood group polymorphism.** *Hum Genet* 1995, **95**(4):407-10.
13. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C: **Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals.** *Nat Genet* 1995; **10**(2):224-8.

14. Howes RE , Patil AP , Piel FB , Nyangiri OA, Kabaria CW, Gething PW, Zimmerman PA, Barnadas C, Beall CM, Gebremedhin A, Ménard D, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI: **The global distribution of the Duffy blood group.** *Nat Commun* 2011; **2**:266.
15. Parasol N, Reid M, Rios M, Castilho L, Harari I, Kosower NS: **A novel mutation in the coding sequence of the *FY*B* allele of the Duffy chemokine receptor gene is associated with an altered erythrocyte phenotype.** *Blood* 1998; **92**:2237–2243.
16. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Le Pennec PY, Roubinet F, Babinet J, Cartron JP, Colin Y: **Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy(x) individuals.** *Blood* 1998, **92**(6):2147-56.
17. Estalote AC, Proto-Siqueira R, Silva WA Jr, Zago MA, Palatnik M: **The mutation G298A-->Ala100Thr on the coding sequence of the Duffy antigen/chemokine receptor gene in non-caucasian Brazilians.** *Genet Mol Res* 2005; **4**(2):166-73.
18. Rot A: **Contribution of Duffy antigen to chemokine function.** *Cytokine Growth Factor Review.* 2005, **16**(6):687-94.
19. Gagnet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA, Elbim C: **Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation.** *Lab Invest* 1998, **78**:755-62.
20. Castilho L, Rios M, Pellegrino J Jr, Saad ST, Costa FF, Reid ME: **A novel FY allele in Brazilians.** *Vox Sang* 2004, **87**(3):190-5.
21. Rovin BH, Lu L, Zhang X: **A novel interleukin-8 polymorphism is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis.** *Kidney Int* 2002, **62**:261–5.
22. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA: **Association study suggests opposite effects of polymorphisms within *IL8* on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004, **114**(3):671–676.
23. Lee EB, Kim JY, Zhao J, Park MH, Song YW: **Haplotype association of *IL8* gene with Behcet's disease.** *Tissue Antigens* 2006, **69**(2):128–132.
24. **ARLEQUIN.** <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3> (Acesso em: 16/01/2013).

25. **Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health** [<http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>] (Acesso em: 16/01/2013).
26. Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, Apple T, Hébert CA, Valente AJ, Baker JB: **Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin.** *J Clin Invest* 1991, **88**(4):1362-9.
27. Cartron JP, Bailly P, Le Van Kim C, Cherif-Zahar B, Matassi G, Bertrand O, Colin Y: **Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens.** *Vox Sang.* 1998, **74** Suppl 2:29-64.
28. Adams DH, and Lloyd AR: **Chemokines: Leukocyte recruitment and activation cytokines.** *Lancet* 1997, **349**:490–495.
29. Okada H, Murakami S: **Cytokine expression in periodontal health and disease.** *Crit Rev Oral Biol Med* 1998, **9**:248–66.
30. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. **Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss.** *J Periodontol* 1994;**65** (3):260–267.
31. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ, Hausmann E: **Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss.** *J Periodontol* 1995; **66**(1):23–29.
32. Nelson RG, Shlossman M, Budding LM, Pettitt DJ, Saad MF, Genco RJ, Knowler WC: **Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians.** *Diabetes Care* 1990; **13** (8):836–840
33. Taylor GW. **Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective.** *Ann Periodontol* 2001; **6** (1):99–112.
34. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. **Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population.** *Community Dent Oral Epidemiol* 2002; **30** (3):182–192.
35. Lalla E, Papapanou PN. **Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases.** *Nat Rev Endocrinol* 2011;**7**(12):738–748
36. Mealey BL. **Periodontal disease and diabetes. A two-way street.** *J Am Dent Assoc* 2006; **137**(Suppl.):26S–31S.
37. Kornman KS: **Diagnostic and prognostic tests for oral diseases: practical applications:** *J Dent Educ* 2005, **69**:498–508.

- 38 Genco RJ: **Current view of risk factors for periodontal diseases.** *J Periodontol* 1996, **67**:1041–9.
- 39 Bergstrom J: **Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease.** *Odontology* 2004, **92**:1–8.
- 40 Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD: **Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis.** *Periodontol 2000* 1997, **14**:173-201.
- 41 Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG Jr, Higginbottom FL, Duff GW: **The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease.** *J Clin Periodontol* 1997, **24**:72–7.
- 42 Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, Mendes-Junior CT, Scarel-Caminaga RM: **Association of haplotypes in the *IL8* gene with susceptibility to chronic periodontitis in a Brazilian population.** *Clin Chim Acta.* 2010, **411**:1264–1268.
- 43 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.
- 44 Dan H, Liu W, Zhou Y, Wang J, Chen Q, Zeng X: **Association of Interleukin-8 gene polymorphisms and haplotypes with oral lichen planus in a Chinese population.** *Inflammation* 2010, **33**:76–81.
- 45 McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, Southgate C, Easton DF, Eeles RA, Howell WM: **Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer.** *Cancer Research* 2002, **62**:3369-3372.
- 46 Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez G I: **Assessment of the toll-like receptor 4Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer.** *BMC Cancer* 2007, **7**:70.
- 47 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.
- 48 Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, Vylliotis A, Wiltfang J, Avgoustidis D, Critselis E, Neukam FW, Patsouris E: **The interleukin-8 (-**

- 251A/T) polymorphism is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma.** *European Journal of Surgical Oncology* 2007, **33**:504 -507.
- 49 Goverdhan V, Ennis S, Hannan SR, Madhusudhana, KC, Cree AJ, Luff AJ, Lotery AJ: **Interleukin-8 promoter polymorphism -251A/T is a risk factor for age-related macular degeneration.** *British Journal of Ophthalmology* 2008, **92**: 537-540.
- 50 Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, Scarel-Caminaga RM: **Lack of association of a functional polymorphism in the interleukin 8 gene with susceptibility to periodontitis.** *DNA Cell Biol* 2009; **28**:185–190.
- 51 Andia DC, de Oliveira NF, Letra AM, Nociti FH Jr, Line SR, de Souza AP: **Interleukin-8 gene promoter polymorphism (rs4073) may contribute to chronic periodontitis.** *J Periodontol* 2011, **82**(6):893-9.
- 52 Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG: **Replication validity of genetic association studies.** *Nat Genet* 2001, **29**:306–309.
- 53 Papapanou PN, Neiderud AM, Sandros J, Dahlén G: **Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status: a case-control study.** *J Clin Periodontol* 2001, **28**(5):389-96.
- 54 Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y: **Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese.** *J Clin Periodontol* 2003, **30**(6):524-31.
- 55 Moreira PR, de Sá AR, Xavier GM, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO: **A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals.** *J Periodontal Res* 2005, **40**(4):306-11.
- 56 Novaretti MCZ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone, DAF: **Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo.** *Rev. bras. hematol. Hemoter* 2000, **22**(1):23-32.
- 57 Guzman S, Karima M, Wang HY, Van Dyke TE: **Association between interleukin-1 genotype and periodontal disease in a diabetic population.** *J Periodontol* 2003, **74**(8):1183-90.

- 58 Gonzales JR, Kobayashi T, Michel J, Mann M, Yoshie H, Meyle J: Interleukin-4 gene polymorphisms in Japanese and Caucasian patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004, 31(5):384-9.

6. CAPITULO III

6.1. Conclusões

- As frequência dos alelos e genótipos *FY* e da maioria dos polimorfismos *IL8*^{-845T>C, -738T>A, -353T>A} foram semelhantes entre pacientes com periodontite crônica e controles (população total e de não fumantes). Exceção foi observada para o polimorfismo *IL8*^{-845T>C} em não fumantes: o alelo -845C, o genótipo -845TC, e o haplótipo CTA foram associados com a suscetibilidade à periodontite crônica.
- Em não fumantes o genótipo CTA/TTT, foi encontrado somente em pacientes.
- Em afro-brasileiros a menor expressão de DARC associado a altas concentrações de IL-8 são protetores ao desenvolvimento da periodontite crônica.
- Em pardos a menor expressão de DARC associado a menor produção de IL-8 são fatores de suscetibilidade à periodontite crônica.
- Quando a produção de IL-8 foi associada à expressão de DARC na superfície das hemácias, suscetibilidade ou proteção à doença foram observados. A presença de neutrófilos no tecido periodontal foi diretamente correlacionada à lesão tecidual e predisposição à periodontite crônica.

6.2. Perspectivas Futuras

Frente aos resultados encontrados pretendemos aumentar o número da amostra, principalmente de indivíduos afro-brasileiros, para maior confiabilidade e clareza da análise dos subgrupos étnicos. Além disso, será realizada uma análise estatística multivariada, porque a periodontite crônica é uma doença multifatorial.

Outros fatores genéticos relacionados à resposta imune deverão ser estudados a fim de avaliar a imunopatogênese na doença periodontal. Dentre estes, o polimorfismo HLA está em andamento. Outros polimorfismos como os de genes KIR e de citocinas também serão avaliados.

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa intitulada ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES DE RESPOSTA IMUNE E ANTÍGENO RECEPTOR DE CITOCINAS DUFFY NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL, coordenado pela professora ANA MARIA SELL da UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ. O objetivo da pesquisa é realizar a tipagem dos genes de resposta imune e dos antígenos eritrocitário Duffy, por técnicas de biologia molecular, em pacientes da região noroeste do estado do Paraná. Para isto a sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: será coletada uma amostra de sangue (10ml) da veia de seu braço. Informamos que poderão ocorrer dor e ardência leve no local da punção venosa que tendem a desaparecer rapidamente. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. As amostras serão armazenadas no Laboratório de Imunogenética da UEM durante o período deste estudo, e somente serão utilizadas para o desenvolvimento dos objetivos acima definidos, e depois serão descartadas. Informamos ainda que as informações obtidas serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa, e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Não há benefícios diretos ou qualquer tipo de remuneração. Estudar os componentes genéticos da resposta imune pode contribuir para o esclarecimento das bases genéticas e no entendimento sobre a doença. Os resultados serão publicados em artigos científicos. Caso você tenha mais dúvidas ou necessite maiores esclarecimentos, pode nos contatar nos endereços abaixo ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da UEM, cujo endereço consta deste documento. Este termo será preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Eu,..... declaro que fui devidamente esclarecido e concordo em participar VOLUNTARIAMENTE da pesquisa coordenada pela Profa. ANA MARIA SELL

_____ Data:.....
Assinatura ou impressão datiloscópica

Eu, Ana Maria Sell declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto de pesquisa supra-nominado.

_____ Data:.....

Assinatura do pesquisador

Qualquer dúvida com relação à pesquisa poderá ser esclarecida com o pesquisador, conforme o endereço abaixo:

Nome: Ana Maria Sell

Endereço: Universidade Estadual de Maringá. Avenida: Colombo, 5790. Bloco I-90 sala 102. CEP 8.020-900. Maringá. Paraná. Telefone (44) 3011-4864. amsell@uem.br

Qualquer dúvida com relação aos aspectos éticos da pesquisa poderá ser esclarecida com o Comitê Permanente de Ética em Pesquisa (COPEP) envolvendo Seres Humanos da UEM, no endereço abaixo:

COPEP/UEM

Universidade Estadual de Maringá.

Av. Colombo, 5790. Campus Sede da UEM.

Bloco da Biblioteca Central (BCE) da UEM.

CEP 87020-900. Maringá-Pr. Tel: (44) 3261-4444

E-mail: copep@uem.br


Anexo 2



Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

CAAE N°. 450.0.093.000-11

PARECER N°.719/2011

Pesquisador(a) Responsável: Ana Maria Sell	
Centro/Departamento: Centro de Ciências da Saúde/ Departamento de Ciências Básicas da Saúde	
Título do projeto: "Associação entre os genes de resposta imune e antígeno receptor de citocinas Duffy no desenvolvimento da doença periodontal."	
Considerações: Trata-se de protocolo de pesquisa de área temática especial II (genética humana), com o objetivo de "avaliar a influência de genes da resposta imune, especificamente do sistema HLA e de regiões promotoras de citocinas, com o desenvolvimento da doença periodontal, como também avaliar a distribuição dos genótipos Duffy." Para a implementação do estudo, pretende-se a participação de 400 sujeitos, sendo 200 pacientes com doença periodontal (diagnosticada por métodos bioquímicos e clínicos), e 200 pacientes saudáveis (para doença periodontal), todos provenientes da Clínica Odontológica (CO) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Em submissão inicial a este comitê, o protocolo restou pendente, conforme parecer 666/2011, para proceder ao atendimento da pendência única, abaixo arrolada: Pendência única: reformular o TCLE com inclusão das instruções e garantias pertinentes ao armazenamento das amostras biológicas coletadas, e ponderação acerca dos benefícios esperados e retorno dos resultados aos sujeitos de pesquisa. Para tanto, recomenda-se a consulta às Resoluções pertinentes (Res. 196/96-CNS, Res. 340/04-CNS e Res.411 11-CNS). Em resposta ao parecer, a pesquisadora encaminhou novo modelo de TCLE, em que assegura a utilização dos dados para os fins específicos do protocolo, com previsão de descarte após o uso. Outrossim, demonstra ter contemplado os demais preceitos éticos regulamentados pela norma ética vigente. Face ao exposto, considera-se a pendência atendida, e o protocolo aprovado na forma em que ora se apresenta.	
Com relação a aplicação do TCLE, conforme instrução operacional do sistema CEP/CONEP, datada de 21/03/2011, os pesquisadores deverão fazer constar, além das assinaturas de ambos (pesquisador e sujeito de pesquisa) nos campos específicos da última página, a rubrica, também de ambos, em todas as folhas do documento (TCLE).	
Situação: APROVADO	
CONEP: (x) para registro () para análise e parecer	Data: 02/12/2011
Relatório Final para Comitê: () Não (X) Sim	Data: 31/12/2013
O protocolo foi apreciado de acordo com a Resolução n°. 196/96 e complementares do CNS/MS, na 230ª reunião do COPEP em 02/12/2011.	 Profa. Dra. Ieda Harumi Higashashi Presidente do COPEP