



# LA GENETICA NELLA PRATICA CLINICA DELL'IGIENISTA DENTALE: IL 6 E IL 10 QUALI FATTORI DI PREDISPOSIZIONE GENETICA ALLA MALATTIA PARODONTALE

GENETICS IN DENTAL HYGIENE PRACTICE: IL 6 E IL 10 FOR PREDICTING GENETIC SUSCEPTIBILITY TO PERIODONTAL DISEASE

**Annalisa Palmieri<sup>1</sup>**  
**Francesca Cura<sup>1</sup>**  
**Gildo Greco<sup>2</sup>**  
**Ignazia Casula<sup>3</sup>**  
**Dorina Lauritano<sup>4</sup>**  
**Ambra Girardi<sup>1</sup>**

- <sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale, Università di Bologna
- <sup>2</sup> Professore a contratto, Università di Milano-Bicocca
- <sup>3</sup> Ricercatore Universitario Confermato, Università di Brescia
- <sup>4</sup> Ricercatrice confermata, Università degli Studi di Milano-Bicocca

## RIASSUNTO

**Scopo del lavoro** La parodontite è una patologia causata principalmente da una infezione cronica dei tessuti di sostegno del dente. Diversi fattori come il diabete, il fumo e la scarsa igiene orale, nonché la predisposizione genetica possono influire sul rischio di insorgenza e progressione della parodontite. Lo scopo del presente studio è di verificare se gli alleli di alcuni geni sono associati all'insorgenza della parodontite.

**Materiali e metodi** È stato effettuato uno studio comparativo su due gruppi di pazienti: 66 con parodontite cronica e 80 soggetti sani come controllo. In totale sono stati studiati sei specifici polimorfismi a carico dei geni codificanti per IL-1A, IL-1B, IL-6, IL-10 e VDR.

**Risultati** I maggiori valori di associazione sono stati ottenuti per i polimorfismi rs1800795 dell'IL-6 ( $P = 0,01$ ) e rs1800872 dell'IL-10 ( $P = 0,04$ ). I soggetti portatori dell'allele raro per le varianti a carico di IL-6 e VDR sono risultati essere meno predisposti alla parodontite, con valori di odds ratio rispettivamente di 0,69 (intervallo di confidenza 95% 0,51-0,93) e 0,79 (intervallo di confidenza 95% 0,59-1,05). L'allele raro per IL-10 ha mostrato, invece, un aumento di rischio pari a odds ratio = 1,38 (intervallo di confidenza 95%, 1,01-1,86).

**Conclusioni** Il presente studio suggerisce che i polimorfismi di IL-6 e IL-10 costituiscono un fattore di rischio per l'insorgenza della parodontite cronica, mentre non è stata rilevata alcuna associazione con un genotipo specifico IL-1A o IL-1B.

**PAROLE CHIAVE** Geni; Infiammazione; Malattia parodontale; Polimorfismo; Riassorbimento osseo.

## ABSTRACT

**Aim** The main cause of periodontitis is a chronic infection of the tissues supporting the teeth. Several factors, such as diabetes, smoking habits and poor oral care, as well as genetic susceptibility can influence the risk of developing periodontitis and its progression. The aim of this investigation was to assess whether alleles of candidate genes are associated to periodontitis.

**Material and methods** A case control study was performed on a cohort of 66 patients with chronic periodontitis and 80 healthy controls. A total of six single-nucleotide polymorphisms from five candidate genes, i.e. IL-1A, IL-1B, IL-6, IL-10 and VDR, were investigated.

**Results** Evidence of association was observed for IL-6 rs1800795 ( $P$  value = 0.01) and IL-10 rs1800872 ( $P = 0.04$ ) genotypes. The presence of the rarer variant alleles of IL-6 and VDR reduced the risk of developing periodontitis, with odds ratio values of 0.69 (Confidence interval 95% 0.51-0.93) and of 0.79 (Confidence interval 95% 0.59-1.05) respectively. Whereas the rare IL-10 allele showed an increased risk, odds ratio = 1.38 (Confidence interval 95%, 1.01-1.86).

**Conclusion** The present investigation shows that IL-6 and IL-10 polymorphisms are a risk factor for chronic periodontitis, but no evidence is related to a specific IL-1A or IL-1B genotype.

**KEYWORDS** Bone resorption; Genes; Inflammation; Periodontal disease; Polymorphism.

## INTRODUZIONE

La malattia parodontale è una patologia multifattoriale, in cui sia fattori ambientali che genetici giocano un ruolo preciso e controverso nel determinarne l'insorgenza. La flora batterica orale riveste sicuramente un ruolo importante nella progressione di tale patologia. Ulteriori fattori di rischio, ampiamente studiati, sono il fumo e il diabete. Tuttavia, anche una serie di fattori genetici dell'ospite possono condizionare la predisposizione individuale all'insorgenza della malattia, determinarne le differenti manifestazioni cliniche e la velocità di progressione (1). Infatti, le malattie multifattoriali, quali quella parodontale, presentano una predisposizione genetica correlata a diversi polimorfismi, diversamente da altre patologie che sono causate da una singola, o poche, mutazioni del gene. Inoltre una comune variazione a livello del codice genetico può determinare sia un'alterazione dell'espressione genica sia cambiamenti funzionali delle molecole codificate, rendendo gli individui con quel genotipo più suscettibili all'insorgenza di una determinata malattia o al manifestarsi di quadri clinici più gravi della malattia stessa (2).

Negli ultimi anni, le indagini sui fattori di predisposizione allo sviluppo della malattia parodontale si sono indirizzati principalmente allo studio di geni coinvolti nell'immunoregolazione quali citochine, recettori della superficie cellulare, chemochine, enzimi e proteine correlate al riconoscimento dell'antigene. Le citochine, come IL-1A, IL-1B, IL-10 e IL-6 sono fattori chiave che mediano il processo infiammatorio nella malattia parodontale. Esse hanno un ruolo nell'attivazione, nella proliferazione e nella differenziazione delle cellule B, le principali cellule implicate nelle manifestazioni severe di parodontite (3). Tali variazioni genetiche possono perciò favorire la progressione della malattia (4), causandone il classico andamento

caratterizzato da cicli ripetuti di infiammazione tissutale, seguiti da remissioni spontanee (definito andamento a *poussés*) (5). Nella malattia parodontale i batteri patogeni accumulati nel solco subgingivale sono i fattori ambientali che influenzano la risposta infiammatoria dei tessuti parodontali (6). Tuttavia, le citochine sono considerate anch'esse indirettamente responsabili della distruzione del tessuto connettivo e del riassorbimento osseo (7).

Dal momento che il riassorbimento osseo alveolare è un fattore chiave nella malattia parodontale, il recettore della vitamina D (VDR) è stato considerato come un fattore di predisposizione nella progressione della malattia.

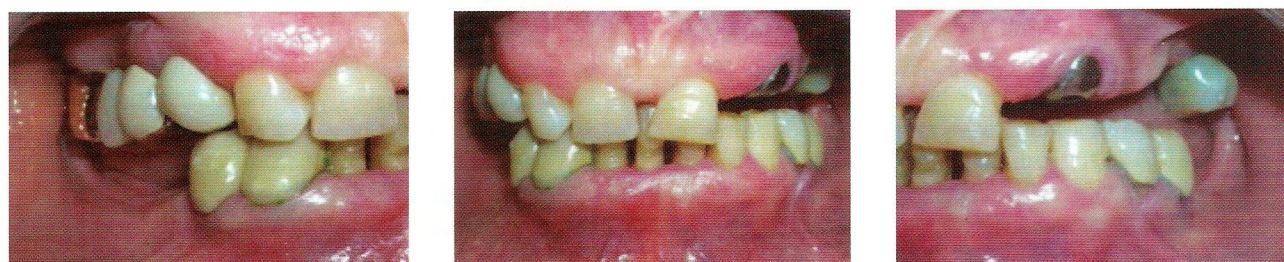
Dati in letteratura sostengono l'esistenza di un'associazione tra comuni polimorfismi a carico di geni candidati e la malattia parodontale (8, 9). È interessante notare che la maggior parte degli studi genetici sulla parodontite hanno impiegato coorti di piccole dimensioni, con conseguente rischio di ottenere risultati falsi positivi e falsi negativi e quindi con un potere statistico inadeguato a rilevare correttamente un'eventuale associazione. Inoltre, il numero e il tipo di geni che influenzano l'andamento della malattia parodontale possono essere diversi in relazione all'etnia del campione studiato e al grado di severità della malattia.

Nel presente lavoro abbiamo analizzato sei specifici polimorfismi a carico dei geni codificanti per IL-1A, IL-1B, IL-6, IL10 e VDR, al fine di verificare se essi agiscano come fattori di suscettibilità della malattia parodontale cronica nella popolazione Italiana.

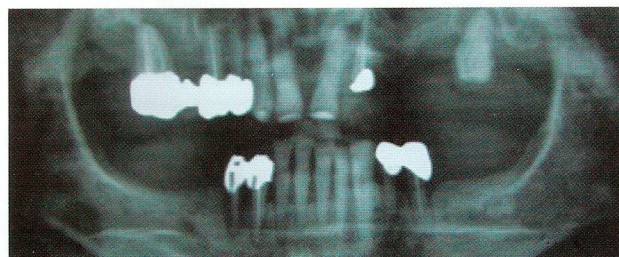
## MATERIALI E METODI

### Pazienti

Per questo studio sono stati reclutati 146 soggetti, di



**FIG. 1, 2, 3, 4** Grave quadro di malattia parodontale. Si osservi la retrazione gengivale, perdita di attacco e di elementi dentari.



PAZIENTI		CONTROLLI	MALATTIE PARODONTALI	
Soggetti (n)		80	66	
Età anni (media±SD)		39±18	58±11	P < 0,001
Genere	maschi (n)	34	32	P = 0,06
	femmine (n)	46	43	
Placca	sì	43	31	P = 0,04
	no	37	33	
BOP	sì	35	32	P < 0,001
	no	45	34	
Fumo	sì	31	27	P = 0,002
	no	49	39	

**TAB. 1** Caratteristiche della popolazione studiata.

cui 66 affetti da malattia parodontale cronica (casi) (Fig. 1-4) e 80 sani o affetti da gengivite (controlli). La tabella 1 riassume le principali caratteristiche e i dati clinici dei due gruppi.

### Genotipizzazione

Sono stati investigati i sei seguenti polimorfismi: per IL-1A il NM\_000575.3:c.-949C>T (rs1800587); per IL-1B il NM\_000576.2:c.315C>T (rs1143634); per IL-6 il XR\_108749.1:n.50-321G>C (rs1800795); per IL-10 il NG\_012088.1:g.3943A>G (rs1800896) e il NG\_012088.1:g.4433A>C (rs1800872); per VDR il NM\_000376.2:c.1056T>C (rs731236).

I saggi SNP sono stati selezionati utilizzando l'Applied Biosystems SNPbrowser Software (Applied Biosystems, Foster City, CA). I genotipi per tutti gli SNP sono stati ottenuti con utilizzo dello strumento ABI PRISM 7500 Sequence Detection System e il metodo TaqMan, secondo i protocolli forniti dall'azienda (Applied Biosystems, Foster City, CA). I genotipi sono stati raccolti dai ricercatori in un sistema cieco (i biologi non avevano a disposizione le informazioni circa la gravità della malattia in relazione ai singoli campioni).

### Analisi statistica

La distribuzione dei genotipi nei pazienti e nei controlli è stata testata per le deviazioni dall'equilibrio Hardy-Weinberg utilizzando il test Pearson  $\chi^2$ . L'associazione genetica è stata valutata con l'impiego di test genotipici ed allelici con un approccio "likelihood ratio" utilizzando il software Unphased v3.1.5 del sistema operativo Windows Vista (10).

Gli Odds ratio sono stati calcolati per valutare il livello di associazione nei portatori dell'allele raro, sia negli individui eterozigoti che omozigoti.

L'associazione aplo-tipica è stata valutata per il cluster IL-1 (IL-1A e IL-1B) e IL-10 perché erano disponibili due polimorfismi correlati. In particolare, è stato eseguito un test di associazione globale, che prova se qualsiasi aplotipo sia associato alla malattia, così come un test di associazione specifico per ciascun aplotipo.

### RISULTATI

L'analisi genetica del DNA genomico del paziente, purificato dal fluido crevicolare, si è rivelata molto efficace: il tasso di successo nella genotipizzazione dei 6 polimorfismi era compreso tra 96% e 99%; solo 20 campioni di DNA su 146 hanno prodotto 3 o meno genotipi.

Le frequenze genotipiche sono risultate essere in accordo con l'equilibrio di Hardy-Weinberg sia nel campione intero che all'interno di ciascun gruppo (i casi e i controlli). Il confronto tra le frequenze alleliche osservate è riportato nella tabella 2. Si è osservata una differenza significativa, tra casi e controlli, per i polimorfismi rs1800795 dell'IL-6 (P = 0,01), e rs1800872 dell'IL-10 (P = 0,04). Valori di associazione marginali sono stati ottenuti invece per lo SNP rs731236 di VDR (P = 0,09). In effetti, le persone portatrici dell'allele raro per le varianti a carico di IL-6 e VDR sono risultate essere meno suscettibili alla parodontite, con valori di odds ratio (OR) = 0,69 (intervallo di confidenza, IC, 95% 0,51-0,93) e OR = 0,79 (IC 95% 0,59-1,05), rispettivamente. L'allele raro per IL-10 ha mostrato invece un aumento di rischio pari a

Gene	SNP ID	alleles A/a	CASO		CONTROLO		ASSOCIAZIONE ALLELICA	
			A (%)	a (%)	A (%)	a (%)	P value	OR (IC 95%)
IL1A	rs1800587	C/T	244 (74)	86 (26)	313 (73)	113 (27)	0,88	0,98 (0,70-1,35)
IL1B	rs1143634	C/T	271 (79)	71 (21)	336 (79)	92 (21)	0,80	0,97 (0,77-1,36)
IL6	rs1800795	G/C	243 (69)	111 (31)	261 (60)	173 (40)	0,01	0,69 (0,51-0,93)
IL10	rs1800896	A/G	234 (66)	118 (34)	273 (63)	161 (37)	0,30	0,85 (0,64-1,15)
IL10	rs1800872	C/A	233 (65)	123 (35)	321 (72)	123 (28)	0,04	1,38 (1,01-1,86)
VDR	rs731236	T/C	202 (59)	138 (41)	230 (53)	200 (47)	0,09	0,79 (0,59-1,05)

**TAB. 2** Analisi dell'associazione allelica con la malattia parodontale.

gene	SNP ID	CASO			CONTROLLO			ASSOCIAZIONE		ETEROZIGOTI	OMOZIGOTI
		AA	Aa	aa	AA	Aa	aa	P value	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	
IL1A	rs1800587	93	58	14	116	81	16	0.82	0.89 (0.58-1.38)	1.09 (0.51-2.35)	
IL1B	rs1143634	106	59	6	130	76	8	0.97	0.95 (0.62-1.45)	0.92 (0.31-2.73)	
IL6	rs1800795	85	73	19	75	11	31	0.02	0.58 (0.37-0.89)	0.54 (0.28-1.04)	
IL10	rs1800896	81	72	23	93	87	37	0.53	0.95 (0.62-1.46)	0.71 (0.39-1.30)	
IL10	rs1800872	75	83	20	115	91	16	0.10	1.40 (0.92-2.12)	1.91 (0.93-3.93)	
VDR	rs731236	58	86	26	61	108	46	0.23	0.84 (0.53-1.32)	0.59 (0.33-1.08)	

**TAB. 3** Analisi dei dati della distribuzione e associazione genotipica tra gruppi.

Gene	Aplotipo	CASO		CONTROLLO		ASSOCIAZIONE	
		n	(%)	n	(%)	P value	OR (IC 95%)
IL1A-IL1B	C-C	231	(70)	290	(71)	0.95	1
IL1A-IL1B	C-T	30	(9)	31	(8)	0.45	1.21 (0.70-2.07)
IL1A-IL1B	T-C	12	(4)	17	(4)	0.69	0.88 (0.40-1.94)
IL1A-IL1B	T-T	55	(17)	72	(17)	0.79	0.96 (0.65-1.42)
IL10	A-C	114	(33)	151	(35)	0.60	1
IL10	A-A	116	(34)	119	(28)	0.06	1.29 (0.91-1.84)
IL10	G-A	112	(33)	160	(37)	0.19	0.93 (0.66-1.31)

**TAB. 4** Analisi dell'aplotipo di due loci candidati e malattia parodontale.

OR = 1,38 (IC 95% 1,01-1,86).

Il test di associazione genotipica ha fornito risultati simili (Tab. 3). Il polimorfismo rs1800795 di IL-6 ha mostrato una significativa associazione genotipica globale (valore di  $P = 0,02$ ) e un minor rischio per i portatori dell'allele raro sia in eterozigosi che in omozigosi, con odds ratio rispettivamente di 0,58 (IC 95% 0,37-0,89) e 0,54 (IC 95% 0,28-1,04); valori, vicini ai livelli nominali di significatività.

Sono stati evidenziati alti livelli di linkage disequilibrium fra gli SNPs del cluster di geni dell'IL-1 ( $D' = 0,75$ ;  $r_2 = 0,44$ ) e tra gli SNPs del gene IL-10 ( $D' = 0,93$ ;  $r_2 = 0,22$ ). Questo ci ha permesso di combinare i dati di due marcatori adiacenti per eseguire l'analisi dell'associazione aplotipica. L'analisi statistica complessiva, per testare se alcun aplotipo fosse associato, non ha evidenziato alcuna associazione con il cluster genico dell'IL-1 ( $P = 0,87$ ), e nemmeno per il locus dell'IL-10 ( $P = 0,16$ ). I valori specifici di associazione e gli odds ratio stimati per ciascun aplotipo, sono riportati in Tabella 4. L'aplotipo rs1800896 (A)-rs1800872 (A) ha mostrato un livello di associazione con la parodontite borderline OR = 1,29 (IC 95% 0,91-1,84), p-value = 0,06.

## DISCUSSIONE

Molti studi hanno valutato l'associazione tra varianti

genetiche e malattia parodontale, tuttavia non vi è ancora un accordo tra gli studiosi per quanto riguarda le correlazioni tra basi genetiche e manifestazioni cliniche di questa patologia. Infatti, i numerosi studi hanno riportato risultati contrastanti. Questo è principalmente legato alla diversa etnia delle popolazioni studiate, ma anche alle piccole dimensioni dei campioni oggetto di studio. Infatti studi di piccole dimensioni, con meno di 100 pazienti e 100 controlli, non sono in grado di fornire una potenza statistica in grado di rilevare un moderato effetto genetico, cioè un odds ratio di 1,5 o inferiore. Un'altra fonte di variabilità potrebbe essere correlata al disegno dello studio, essendo i diversi studi focalizzati su fenotipi specifici, come parodontite aggressiva, parodontite cronica, o la risposta ai trattamenti. Qui abbiamo riportato i risultati di uno studio genetico effettuato su 66 pazienti affetti da parodontite cronica e 80 controlli, tutti di origine italiana. Il fluido crevicolare raccolto con una sonda di carta è stato usato come fonte di DNA genomico (Fig. 5-7). L'efficienza del test genetico su questo DNA è risultata alta, in effetti ha fornito circa il 98% dei genotipi. I risultati delle analisi di associazione genetica dei loci differenti sono discussi di seguito per ciascun locus.

### IL-1A and IL-1B

IL-1A e IL-1B gene e sette altri geni della famiglia dell'interleuchina 1 formano un cluster genico delle



FIG. 5, 6, 7 Kit per il test batterico del "red complex" e modalità di prelievo.

citochine sul cromosoma 2. I polimorfismi a carico di IL-1A e IL-1B sono stati tra i primi e maggiormente indagati per l'associazione con la parodontite. Nel presente lavoro non abbiamo trovato alcuna prova di associazione tra rs1800587 (noto anche come IL-1A-889C> T), rs1143634 (anche conosciuto come IL-1B 3954 C> T) e la malattia. Degno di nota è l'odd ratio poiché era vicino a 1 sia nell'analisi di associazione allelica che nell'analisi di genotipica in entrambi gli alleli e l'analisi di associazione del genotipo, suggerendo che non vi è alcuna tendenza all'associazione. Risultati simili sono stati ottenuti quando entrambi i polimorfismi sono stati analizzati insieme nell'analisi degli aplotipi (Tab. 4). In una recente review su un'indagine condotta in almeno 100 individui sia nei casi che nei controlli gli autori hanno concluso che i polimorfismi del cluster genico IL-1 non possono essere considerati come fattori di rischio o di suscettibilità di parodontite aggressiva o cronica (9). I nostri risultati, ottenuti su un campione di popolazione italiana, supportano ulteriormente questa affermazione. D'altra parte, una recente meta-analisi, che prendeva in considerazione 13 studi effettuati su pazienti caucasici affetti da malattia parodontale cronica, ha rilevato correlazioni significative per le due varianti geniche individuali (IL-1A OR = 1.48 e IL-1B OR = 1.54). Considerando che la dimensione del campione del nostro studio è in grado di individuare tale livello di associazione (potenza del calcolo non riportata) si può concludere che l'eterogeneità genetica è probabilmente presente tra i caucasici, dato che i polimorfismi dell'IL-1 non sono risultati associati alla malattia parodontale nella popolazione Italiana. Altri autori non riportano alcuna associazione con la parodontite aggressiva nella popolazione Italia (11).

#### IL-6

I polimorfismi mappanti in IL-6 sono ripetutamente segnalati come fattori di rischio sia per la parodonti-

te cronica che aggressiva in diverse popolazioni; altri studi invece mostrano un'associazione negativa (9). Conseguentemente gli autori affermano che non si può trarre nessuna conclusione certa riguardo questo locus. Nel nostro studio abbiamo trovato il livello più forte di associazione: la variante allelica rs1800795-C (nota anche come IL-6-174G> C) era significativamente meno rappresentata nei pazienti affetti da malattia parodontale. Questo sta ad indicare che i portatori dell'allele rs1800795-C presentavano un minor rischio di sviluppare malattia parodontale come precedentemente osservato da altri ricercatori (9).

#### IL-10

È stato proposto che IL-10 possa rallentare la distruzione del tessuto parodontale attraverso l'induzione di inibitori tissutali delle metalloproteinasi e dell'osteoprotegerina, noto inibitore di osteoclastogenesi (12). Nel nostro studio abbiamo indagato due polimorfismi nella regione promotoriale di IL-10 e dimostrato che la variante allelica rs1800872-A ha aumentato il rischio di sviluppare parodontite con un OR osservato di 1,38 (IC 95% 1,01-1,86). È interessante notare che Reichert et al. hanno dimostrato che questo allele è funzionale nello sviluppo della malattia cronica, essendo associato a una ridotta espressione di IL-10 (13).

#### VDR

Il recettore della vitamina D (VDR) regola una varietà di processi biologici, compresi il metabolismo osseo e la risposta immunitaria alle infezioni microbiche (14). Visto che il riassorbimento osseo alveolare e l'accumulo di batteri sono le caratteristiche principali della malattia parodontale, è possibile che il recettore della vitamina D (VDR) e suoi polimorfismi genetici giochino un ruolo nella suscettibilità all'insorgenza di malattia parodontale. Nel nostro studio abbiamo trovato un'associazione suggestiva tra VDR e que-

sta patologia, sebbene al limite della significatività statistica. Un'indagine supplementare con dati indipendenti o marcatori diversi sarà in grado di fornire ulteriori informazioni per chiarire il ruolo di VDR nella parodontite.

## CONCLUSIONI

Nel nostro studio abbiamo dimostrato un'associazione statisticamente significativa tra le varianti alleliche comuni, IL-6 rs1800795-G e IL-10 rs1800872-A, e la malattia parodontale. Tali dati suggeriscono un possibile uso di questi polimorfismi in un test basato sul DNA per migliorare la diagnostica della malattia parodontale. Ulteriori sviluppi del nostro studio potrebbero consentire in un'applicazione nella pratica clinica dell'Igienista Dentale. Le conoscenze genetiche potrebbero risultare di grande utilità in particolare nella diagnostica della malattia parodontale, nella definizione di un piano terapeutico personalizzato per ogni singolo paziente in relazione a differenti quadri clinici. Inoltre potrebbe dare indicazioni prognostiche sull'esito della malattia.

## RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato sostenuto dalla LAB ® srl, Cogigoro (Fe), Italia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 Suppl 6: 196-209.
2. Craandijk J, van Krugten MV, Verweij CL, van der Velden U, Loos BG. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 28-34.
3. Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E, Polak B, Seymour GJ, Hara K. IL-4- and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue. *J Oral Pathol Med.* 1994; 23: 347-53.
4. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB Jr., Line SR. Investigation of IL4 gene polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 341-5.
5. Duff GW. Molecular genetics of cytokines: Cytokines in chronic inflammatory disease. In: Thompson, editor. *The cytokine handbook.* London: Academic Press., 1998. p. 21-33.
6. Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontol Res.* 1996; 31: 393-407.
7. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9: 248-66.
8. Karimbux NY, Saraiya VM, Elangovan S, Allareddy V, Kinnunen T, Kornman KS, Duff GW. Interleukin-1 gene polymorphisms and chronic periodontitis in adult whites: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2012 Nov; 83(11):1407-19.
9. Laine ML, Loos BG, Crielaard W. Gene polymorphisms in chronic periodontitis. *Int J Dent.* 2012; 2010: 324719.
10. Dudbridge F, Gusnanto A. Estimation of significance thresholds for genomewide association scans. *Genet Epidemiol.* 2008; 32: 227-34.
11. Scapoli C, Borzani I, Guarnelli ME, Mamolini E, Annunziata M, Guida L, Trombelli L. IL-1 gene cluster is not linked to aggressive periodontitis. *J Dent Res* 2010 May; 89(5): 457-61.
12. Claudino M, Trombone AP, Cardoso CR, Ferreira SB Jr, Martins W Jr, Assis GF et al. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *J Leukoc Biol.* 2008; 84: 1565-73.
13. Reichert S, Machulla HK, Klapproth J, Zimmermann U, Reichert Y, Glaser CH, et al. The interleukin-10 promoter haplotype ATA is a putative risk factor for aggressive periodontitis. *J Periodontol Res.* 2008; 43: 40-7.
14. Amano Y, Cho Y, Matsunawa M, Komiyama K, Makishima M. Increased nuclear expression and transactivation of vitamin D receptor by the cardiotoxic steroid bufalin in human myeloid leukemia cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009; 114: 144-51.