

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/03/2018.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



GIOVANA ANOZZI

INVESTIGAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE HAPLÓTIPOS NO GENE
INTERLEUCINA 4

ARARAQUARA

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



GIOVANA ANOVAZZI

INVESTIGAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE HAPLÓTIPOS NO GENE

INTERLEUCINA 4

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Periodontia – Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

ARARAQUARA

2016

Anovazzi, Giovana

Investigação da funcionalidade de haplótipos no gene IL4 / Giovana Anovazzi .-- Araraquara: [s.n.], 2016.
121 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

1. Doenças periodontais 2. Polimorfismo genético 3. Expressão gênica I. Título

GIOVANA ANOVAZZI

**INVESTIGAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE HAPLÓTIPOS NO GENE
*INTERLEUCINA 4***

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

2º Examinador: Prof. Dr^ª. Andrea Marcia Marcaccini

3º Examinador: Prof^ª. Dr. Ricardo Della Coletta

4º Examinador: Prof^ª. Dr. Carlos Rossa Junior

5º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara, 28 de Março de 2016.

Giovana Anovazzi

Dados curriculares

Nascimento	25 de Novembro de 1986 – Catanduva – SP
Filiação	Allan Anovazzi Margarete Maretti Anovazzi
2005 - 2008	Curso de graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr Universidade Estadual Paulista – UNESP
2009 - 2010	Curso de Especialização em Periodontia – Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr Universidade Estadual Paulista – UNESP.
2010 - 2012	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia – Nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr Universidade Estadual Paulista – UNESP.
2013 - 2014	Curso de Especialização em Odontopediatria – Apcd Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – Araraquara.
2012 - 2016	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia – Nível Doutorado Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Dedico este trabalho...

À **Deus**. Primeiramente pela minha vida! Por sempre estar presente, me amparar e me acompanhar em todos os momentos! Por sempre me confortar nos momentos difíceis. Pela Fé absoluta e pela certeza que sinto que está sempre ao meu lado me amparando.

Aos meus pais, **Allan Anovazzi** e **Margarete Anovazzi**, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando em cada decisão a ser tomada. Por todo amor a mim dedicado, compreensão e incentivo! Pelas palavras de carinho e por sempre confiarem em mim! Por me ensinarem que com muito trabalho, garra, ética persistência e **amor** Podemos Conseguir Tudo Aquilo Que Desejamos!! Obrigada por sempre me mostrarem o melhor caminho a ser seguido! Tenho imenso orgulho de ter vocês como meus Pais! Agradeço a Deus por ter colocado vocês na minha vida! E aos meus irmãos **Allan** e **Cris** por estarem sempre presentes, por todo companheirismo, carinho, apoio e amizade, Amo vocês!!

Ao meu esposo, **Marcell Costa de Medeiros**, por ser essa pessoa excepcional, maravilhoso e encantador. Por toda paciência, compreensão, companheirismo e **amor**! Você foi e é fundamental para minha **vida**, e também foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, obrigada por não me deixar desistir e por estar sempre ao meu lado me dizendo: Vamos lá, você consegue! Estou aqui pro que precisar! Tudo isso foi muito importante!! Muito obrigada pelas infinitas vezes que só me abraçava e eu sentia que assim estava segura. Obrigada por EXISTIR! **TE AMO INFINITAMENTE!**

Agradeço especialmente...

À minha orientadora e amiga, **Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga**, por ser essa pessoa única e especial. Agradeço a Deus por ter me colocado no seu caminho, e por você acreditar que eu era capaz de desenvolver os seus projetos. Obrigada pelas inúmeras horas de conversas sobre a tese e principalmente sobre a **vida!** Obrigada pelo ombro amigo muitas vezes que eu precisei! Obrigada por toda confiança depositada em mim desde o começo, pelos infinitos ensinamentos que aprendi com você durante todos esses 10 anos de boa convivência como sua orientada. Admiro sua postura, sua índole, sua dedicação, sua competência e seu **Amor por tudo que você faz!** Obrigada por me permitir fazer parte do seu convívio diário, sou e serei imensamente grata à você por Tudo!!

Ao **Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior**, por toda competência e apoio no desenvolvimento deste trabalho. Por todos os ensinamentos transmitidos durante as aulas, na metodologia deste trabalho, sua paciência e tranquilidade que me passava quando me ensinava as cirurgias na especialização de periodontia. Você professor, é um exemplo de dedicação e competência com o seu trabalho! Com toda certeza, é um exemplo a ser seguido! Sempre digo ao Marcell para aprender ao máximo com o senhor!

Às minhas grandes amigas **Suzane Pigossi, Luana Pires Verzola e Andressa Vilas Boas**, que são as Lindas! Que são fundamentais para o meu riso! Me escutam, me ensinam, me aconselham, cada uma com seu jeito especial e particular de ser. Estando sempre ao meu lado, me apoiando, e muitas vezes me mostrando o melhor caminho. É muito bom poder contar com vocês! Sei que sempre terei um ombro amigo, alias Três!

A minha amiga **Thamiris Orrico Rodrigues**, por ser minha irmã de coração! A melhor dupla de pediatria que eu poderia ter. Obrigada pelo carinho e por ser essa pessoa Maravilhosa que eu tanto admiro! Sinto saudades, sempre.

A minha amiga **Livia S. Finoti**, por ser essa companheira de jornada! Por todos as experiências divididas, pelo carinho, apoio que sempre me dedicou! Obrigada por todos os momentos proporcionados e pelos anos de amizade.

Às minhas amigas **Sâmia e Sâmara**, obrigada pela convivência diária, pelo carinho de sempre, com certeza vocês são pessoas especiais!! Adoro muito vocês.

Aos casais de amigos, **Luana e Mário, Andressa e Júlio, Ana e Lucas, Thamiris e Eduardo**, por toda amizade, pelos inúmeros jantares, passeios, viagens com vocês. Vocês são especiais e quero levar vocês comigo para o resto da vida! Com certeza vocês fizeram meus dias mais alegres e felizes!

Ao casal **Diana e Edgard** que trouxeram alegria nos nossos dias frios em Michigan! Vocês se tornaram tão especiais! Obrigada por todos os conselhos e por torcerem sempre por nós. Podem acreditar também que estamos na torcida do melhor para vocês sempre!

Aos meus amigos **João Paulo Steffens e Fausto Frizera** pelos bons momentos de amizade vividos durante esses anos de convivência. Obrigada por fazerem parte do nosso dia a dia! Vocês são pessoas queridas e especiais para nós! Acreditamos que nossa amizade prevalecerá apesar das distâncias.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética, **Suzane, Livia, Sâmia, Rafael, Romerito, Thamires, Bruna e Larissa**. Tenho certeza que somos um verdadeiro grupo, que juntos nos ajudamos e nos apoiamos! Desejo nada menos que sucesso para todos vocês!

Às minhas grandes amigas inesquecível da Turma 80, **Ana Lígia Micelli, Maria Emília Pontes e Maria Eugênia Lunardi**. Tivemos momentos inesquecíveis juntas. Vocês não imaginam a falta que me fazem aqui em Araraquara! Não há distância capaz de mudar o tamanho do carinho, amor e respeito que tenho por vocês!

À **Profa. Dra. Ticiana Capote** sempre tão presente, por toda amizade! Pelas palavras de carinho e pelos inúmeros conselhos! Pelas tarde de café da tarde, ou pelos jantares. Por todas as vezes que em prantos em chegava na sua sala e sempre me recebia com um abraço e uma palavra de carinho! Sempre me dando forças! Obrigada por tudo Tici, você é especial pra mim!

À **Família Anovazzi e Maretti**, minha família obrigada pelo carinho de sempre e por todo apoio! Sou imensamente feliz de tê-los ao meu lado, sabendo sempre que posso contar com vocês para o que eu precisar. Estamos juntos desde sempre e assim vamos continuar! Adoro cada um de vocês!

À Família **Costa de Medeiros**, por serem minha segunda família e me fazerem sentir em casa lá em Natal. Em especial, a **Lourdinha, Arnaldo e Arnaldo Jr.** obrigada pelo carinho por todo apoio e por me receberem tão bem nesta família! Fico imensamente feliz de saber que posso contar com vocês.

*“A gente precisa continuar acreditando: que vale a pena ser honesto,
estudar e trabalhar. Que é preciso construir: a vida, o futuro, o caráter,
a família, as amizades e os amores”*

(Luft)

Agradeço...

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP)**, na pessoa da sua Diretora, Profa. Dra. **Andreia Affonso Barretto Montandon**, e da Vice-Diretora, **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, **Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior**, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação do Programa de Periodontia, pela excelente formação, dedicação, competência e empenho em suas atividades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**, pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa (2013/17887-8) e pela concessão da bolsa de Doutorado (2014/04638-2).

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, Prof. Dr. **Elcio Marcantonio Junior**, Profa. Dra. **Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, Prof. Dr. **Carlos Rossa Júnior**, Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, Prof. Dr. **José Eduardo César Sampaio**, Profa. Dra. **Silvana Regina Perez Orrico**, **Daniela Leal Zandim Barcelos** que colaboraram com a minha formação.

Aos meus amigos de turma de Doutorado: **Fausto, Fernanda, Livia, Luiz Guilherme, Marcell, Rafael e Sabrina**, pelo companheirismo, amizade e momentos de descontração.

À todos os funcionários e ex-funcionários da Disciplina de Periodontia, **Isabela, Suleima, D. Maria do Rosário, Maria José (Zezé), Priscila, Regina Lúcia, Claudinha, Ester**, cujo trabalho e dedicação possibilitou a realização desse trabalho.

À todos os funcionários do Departamento de Morfologia, especialmente **Margarete, Marcelo e Ronaldo**, pela atenção e disponibilidade que sempre me atenderam e cederam um ombro amigo.

Aos funcionários e ex-funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara, José Alexandre e Cristiano**, pela gentileza com que sempre me receberam, paciência, competência e por resolverem tantas dúvidas.

Aos funcionários da Biblioteca, **Marley, Eliane, Adriano, Maria Inês e Ceres**, pela disposição de sempre.

Aos **Pacientes**, que se fazem necessários para a realização desta pesquisa e que tanto colaboraram, contribuindo com a realização dos exames clínicos e coletas. Meu imenso agradecimento. Muito obrigada.

À todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.

*Aprendi que vai demorar muito para me transformar
na pessoa que quero ser, e devo ter paciência!
Mas aprendi também, que posso ir além dos limites
que eu próprio Coloquei!!
(Charles Chaplin)*

Anovazzi G. Investigação da funcionalidade de haplótipos no gene *Interleucina 4* [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

A Doença Periodontal (DP) tem caráter multifatorial, com influência de fatores como a presença de microrganismos periodontopatogênicos, reação do sistema imune, suscetibilidade genética do hospedeiro, hábito de fumar, stress e presença de doenças sistêmicas. O tecido periodontal inflamado produz várias citocinas, dentre elas a interleucina 4 (IL-4). Estudos realizados por este grupo identificaram que indivíduos carregando os polimorfismos -590(T/C), +33(T/C) e VNTR(I/D) no gene *IL4* formando o haplótipo TCI/CCI são 5 vezes mais suscetíveis à DP (*Odds Ratio* ajustado= 5,3; 95% Intervalo Confiança = 2,2 -12,9), enquanto o haplótipo TTD/CTI conferiu proteção contra o desenvolvimento da DP, *Odds Ratio* ajustado= 0,18 (95% Intervalo Confiança = 0,04 - 0,88). Assim, para verificar a funcionalidade dos haplótipos no gene *IL4*, o objetivo deste estudo foi investigar possíveis diferenças na resposta imune frente a estímulos inflamatórios e de bactérias periodontopatogênicas em células coletadas do sangue de pacientes que carregam tais diferentes haplótipos. A funcionalidade dos referidos haplótipos no gene *IL4* foi também investigada por meio da regulação da expressão do gene repórter presente em plasmídeos recombinantes construídos artificialmente (constructos). Foram coletados sangue periférico de 5 pacientes de cada haplótipo e estimulados com mediadores inflamatórios e bactérias periodontopatogênicas para se avaliar a expressão gênica (mRNA, RT-qPCR), proteínas secretadas (Multiplex) e proteínas intracelulares caracterizando o perfil fenotípico celular (Citometria de fluxo). Constructos contendo cada haplótipo foram transfectados em células JM e sua

funcionalidade foi avaliada por meio da expressão do gene repórter GFP utilizando citometria de fluxo. Independente do tipo de estímulo à que as culturas celulares foram submetidas, foram detectados níveis mais elevados de mRNA e da proteína IL-4 no grupo do haplótipo CTI/TTD, que também apresentaram níveis mais elevados de outras citocinas anti-inflamatórias. Culturas celulares com o haplótipo TCI/CCI mostraram resultado oposto; isto é, níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias. Observou-se também que o constructo TCI apresentou os maiores níveis de expressão de GFP em comparação ao constructo contendo apenas o polimorfismo na região promotora. Conclui-se que os haplótipos formados por polimorfismos no gene *IL4* influenciaram os níveis de expressão genica e de proteínas.

Palavras-Chave: Doenças periodontais. Polimorfismos genéticos. Expressão gênica.

Anovazzi G. Investigation of functionality of the haplotypes in the IL4 gene. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is multifactorial, with the influence of factors such as the presence of periodontopathogenic micro-reaction of the immune system, genetic susceptibility of the host, smoking, stress and presence of systemic diseases. The inflamed periodontal tissue produces various cytokines, among which interleukin 4 (IL-4). Studies by this group found that subjects carrying the -590 polymorphism (T/C) +33 (T/C) and VNTR (I/D) in the IL4 gene haplotype forming the TCI/CCI are 5 times more susceptible to PD (ORadjusted= 5.3; 95% CI = 2.2 - 12.9), while the TTD/CTI haplotype conferred protection against the development of PD (ORadjusted= 0.18; 95% CI = 0.04-0.88). So, to check the functionality of the haplotypes in the IL4 gene, the aim of this study is to investigate possible differences in the immune response against inflammatory and periodontal bacteria stimuli in collected blood cells from patients with different haplotypes. The functionality of these haplotypes in the IL4 gene will also be investigated by means of regulation of expression of the reporter gene present in the recombinant plasmids constructed artificially (constructs). Peripheral blood was collected from 5 patients of each haplotype and stimulated with inflammatory mediators and periodontal bacteria to assess the gene expression (mRNA RT-qPCR), secreted proteins (Multiplex) and intracellular proteins featuring cellular phenotypic profile (flow cytometry). Constructs containing each haplotype were transfected into cells JM and its functionality was evaluated by GFP reporter gene expression using flow cytometry. Regardless of the type of stimulation to which the cell cultures were subjected they were detected higher

levels of mRNA and protein of IL-4 haplotype in the group CTI/TTD, which also showed higher levels of other anti-inflammatory cytokines. Cell cultures to the haplotype TCI/CCI showed the opposite result; i.e., higher levels of pro-inflammatory cytokines. It was also observed that the TCI construct showed the highest levels of GFP expression compared to the construct containing only the polymorphism in the promoter region. In conclusion the haplotypes formed by polymorphisms in the IL4 gene influenced the gene expression levels and protein.

Keywords: Periodontal diseases. Gene polymorphism. Gene expression.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 PROPOSIÇÃO	22
3 PUBLICAÇÃO 1	23
4 PUBLICAÇÃO 2	52
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
6 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE	85
ANEXO	120

1 INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal (DP) é caracterizada por um processo inflamatório destrutivo que afeta os tecidos de suporte do dente, a qual tem origem infecciosa (Fleming⁹, 1999; Vergnes et al.³¹, 2009). O acúmulo de bactérias no sulco gengival pode desencadear um processo inflamatório que, se não tratado, destrói o periodonto, e eventualmente resulta em perda dos dentes (Heitz-Mayfield¹³, 2005).

A resposta do hospedeiro é considerada como fator chave na patogênese da periodontite (Darveau et al.⁷, 2000). Cerca de 20% das doenças periodontais é atribuída à variação bacteriana, 50% têm sido atribuídas à variância genética e mais de 20% ao uso de tabaco (Loss et al.¹⁷, 2003; Page et al.²², 2000). Dessa forma a doença periodontal é considerada uma patologia de caráter multifatorial (Loss et al.¹⁷, 2003).

Uma importante citocina relacionada com a resposta imune que apresenta variações genéticas associadas ao fenótipo de doença periodontal destrutiva é a IL-4. O gene *IL4* compreende quatro exons, possui tamanho aproximado de 10 kb (GenBank nº M23442), e está localizado no cromossomo 5q31.1 (Arai et al.⁵, 1989), juntamente com outros genes de citocinas Th2, tais como: IL-3, -5, -9, -13 e -15¹⁶. A IL-4 é uma citocina, derivada de células Th2, que desempenha várias funções importantes no sistema imune como: a) diminui potentemente a função de macrófagos; b) atua como mitógeno de células B e induz sua diferenciação após estímulo com LPS de bactérias; c) estimula a mudança do isotipo da célula B de IgM para IgE; d) diferencia linfócitos T virgens em subpopulações Th2 (Abbas et al.¹, 2003). A IL-4 estimula células Th2 e inibe as funções de células Th1 (Bozkurt et al.⁶, 2006; Tsai et al.³⁰, 2007). Por esses motivos o envolvimento da IL-4 na DP tem sido investigado, mostrando, contudo, resultados

contraditórios (Manhart et al.¹⁸, 1994; Michel et al.²¹, 2001; Salvi et al.²⁵, 1998; Scarel-Caminaga et al.²⁶, 2003). Referente à quantidade de IL-4 encontrada no fluido sulcular de sítios afetados pela DP, que vão desde a ausência (Fujihashi et al.¹⁰, 1993; Michalowicz et al.²⁰, 2000; Shapira et al.²⁷, 1992; Yamamoto et al.³², 1997) ou baixa quantidade Salvi et al.²⁵, 1998) até alta concentração de IL-4 (Kamma et al.¹⁵, 2004).

Polimorfismos nos genes que codificam interleucinas podem explicar as diferenças individuais dos seus níveis proteicos, principalmente se dentro de regiões promotoras. Um estudo realizado pelo presente grupo de pesquisa investigou polimorfismos no gene *IL4* em 250 indivíduos com e sem DP, e demonstrou que um polimorfismo de base única ou *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) no locus -590 (T/C; promoter region, rs2243250) do gene *IL4* foi estatisticamente diferente quanto à frequência de alelos ($p=0,021$), e de genótipos ($p=0,0008$) entre os grupos com e sem DP⁴. A análise da “razão das chances” ou “Odds Ratio”(OR) demonstrou que indivíduos com pelo menos um alelo T têm 2,51 vezes mais chance de desenvolver DP ($p=0,0008$; OR = 2,51; 95% IC = 1,49 – 4,23). No locus +33(C/T, região 5’UTR or -34 contando a partir do codon de start; rs2070874), verificou-se diferença estatística na frequência de alelos ($p= 0,0007$) e de genótipos ($p= 0,0067$) entre os grupos Controle e DP, observando que indivíduos que possuem o alelo T (+33) estão mais protegidos contra o desenvolvimento da DP (OR=0.49; 95% IC= 0,33 – 0,73). Concordando com nosso estudo, Gonzales et al.¹¹ (2007) investigaram os polimorfismos -590(T/C), +33(T/C) em indivíduos com periodontite agressiva, e demonstrou associação dos genótipos -590T/T, +33T/T com esta patologia. Para o polimorfismo do tipo VNTR (repetição em tandem de número variável, inserção/deleção de 70 pb no intron 3, or indel, rs2234665), foi

observada diferença significativa na distribuição de alelos ($p= 0,0031$) e de genótipos ($p= 0,0026$) entre os grupos controle e DP. Indivíduos com o alelo I (inserção de 70pb) foram 2 vezes mais suscetíveis à DP (OR = 2,12 95% IC= 1,30-3,43). A análise dos genótipos reforçou a associação do alelo I com a suscetibilidade à DP ($p=0,0006$; OR = 2,62 95% IC= 1,48-4,65). Dessa forma, o haplótipo TCI/CCI formado pelos polimorfismos -590 (T/C), +33(T/C) e VNTR (I/D), no gene *IL4* se mostra 5 vezes mais suscetível ao desenvolvimento da DP (OR ajustado= 5,3; 95% Intervalo Confiança = 2,2 - 12,9). Enquanto que o haplótipo TTD/CTI foi associado à proteção contra o desenvolvimento da DP (OR ajustado= 0,18 (95% Intervalo Confiança = 0,04 - 0,88) (Anovazzi et al.⁴, 2010). Um estudo realizado por Holla et al.¹⁴ (2008) investigando os mesmos polimorfismos em uma população Tcheca não verificou associação entre alelos e genótipos com a periodontite crônica, entretanto observou associação do haplótipo TTD com a doença. Recentemente uma meta análise sobre a associação entre os polimorfismos -590 (T/C), +33(T/C) e VNTR (I/D) e a suscetibilidade à DP confirmou que o alelo T e o genótipo TT do SNP -590(T/C) foram associados com risco aumentado de periodontite crônica em pacientes brancos (Shen et al.²⁸, 2015).

Em sequência, nosso grupo de pesquisa verificou que comparando indivíduos geneticamente suscetíveis à DP (TCI/CCI) com os geneticamente protegidos (TTD/CTI) não houve diferença significativa quanto à resposta ao tratamento periodontal por meio da análise dos índices clínicos periodontais. No entanto, a concentração da proteína IL-4 foi significativamente maior nos pacientes que carregavam o haplótipo TTD/CTI, 45 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico (Anovazzi et al.³, 2013). Também verificou-se que indivíduos geneticamente suscetíveis à DP por carregarem o haplótipo TCI/CCI

tiveram maiores níveis de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* quando comparados a pacientes geneticamente protegidos contra a DP por carregarem o haplótipo TTD/CTI no gene *IL4* (Finoti et al.⁸, 2013).

Apesar dos resultados desses estudos clínicos e de associação caso-controle, não se sabe de que forma os referidos haplótipos podem influenciar a regulação da expressão de IL-4 e a colonização bacteriana, modulando a resposta imune relacionada à DP. Estudos enfocando a funcionalidade de SNPs contribuem para o conhecimento da relevância biológica ou da função utilizando controlados experimentos *in vitro*. Observando a literatura científica, tem sido notada maior tendência em investigar a funcionalidade de SNPs associados com diversas doenças.

Portanto, pretende-se neste estudo investigar a funcionalidade dos referidos haplótipos no gene *IL4*, considerando: a relevância da resposta imune para o início e progressão das doenças periodontais; a natureza dinâmica da resposta imune, tanto inata quanto adaptativa atuando simultaneamente e exercendo atividade modulatória recíproca; a escassez de informações sobre o papel funcional dos haplótipos no gene *IL4*; o fato dos polimorfismos/haplótipos neste gene serem frequentemente escolhidos para investigação em estudos de associação do tipo caso-controle com as mais diversas patologias. Com a realização do presente estudo acredita-se que é de grande relevância o preenchimento dessa lacuna no conhecimento da genômica funcional, dentro do contexto de doenças inflamatórias, inclusive da DP. Assim, este estudo foi realizado para tentar responder a hipótese de que os referidos haplótipos no gene *IL4* podem influenciar a atividade transcricional e/ou traducional, com potencial consequência na modulação da resposta imune.

6 CONCLUSÃO

- Considerando os resultados da Publicação 1, conclui-se que frente ao estímulo inflamatório foi observado um padrão de resposta imune diferente e oposto para cada um dos 2 haplótipos no gene *IL4*. O haplótipo CTI/TTD foi relacionado a um perfil de resposta mais anti-inflamatório, enquanto o haplótipo TCI/CCI caracterizou um padrão mais pró-inflamatório. Em relação à análise dos haplótipos isoladamente, foi observado pelos diferentes constructos que o haplótipo CTI promoveu maior atividade transcricional do gene reporter GFP.
- Considerando os resultados da Publicação 2, conclui-se que os haplótipos no gene *IL4* previamente associado à proteção (CTI/TTD) ou suscetibilidade à DP (TCI/CCI) mostraram-se funcionais por influenciar, em células obtidas de pacientes, a expressão de genes e a produção de proteínas com importante função para a resposta imune após estímulos com os periodontopatógenos Aa e Pg. Observou-se que o haplótipo CTI/TTD expressou maiores níveis de mRNA e citocinas anti-inflamatórias e o haplótipo TCI/CCI expressou maiores níveis de mRNA e citocinas pró-inflamatórias.

REFERÊNCIAS *

1. Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2003.
2. Akkad DA, Arning L, Ibrahim SM, Epplen JT. Sex specifically associated promoter polymorphism in multiple sclerosis affects interleukin 4 expression levels. *Genes Immun*. 2007; 8(8): 703-6.
3. Anovazzi G, Finoti LS, Corbi SC, Kim YJ, Marcaccini AM, Gerlach RF, et al. Interleukin 4 haplotypes of susceptibility to chronic periodontitis are associated with IL-4 protein levels but not with clinical outcomes of periodontal therapy. *Hum Immunol*. 2013; 74(12): 1688-95.
4. Anovazzi G, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, et al. Polymorphisms and haplotypes in the interleukin-4 gene are associated with chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Periodontol*. 2010; 81(3): 392-402.
5. Arai N, Nomura D, Villaret D, DeWaal Malefijt R, Seiki M, Yoshida M, et al. Complete nucleotide sequence of the chromosomal gene for human IL-4 and its expression. *J Immunol*. 1989; 142(1): 274-82.
6. Bozkurt FY, Yetkin Ay Z, Berker E, Tepe E, Akkus S. Anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis: a preliminary report. *Cytokine*. 2006; 35(3-4): 180-5.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br#biblioteca/manual>

7. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000*. 1997; 14: 12-32.
8. Finoti LS, Anovazzi G, Pigossi SC, Corbi SC, Teixeira SR, Braido GV, et al. Periodontopathogens levels and clinical response to periodontal therapy in individuals with the interleukin-4 haplotype associated with susceptibility to chronic periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013; 32(12):1501-9.
9. Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1): 32-8.
10. Fujihashi K, Beagley KW, Kono Y, Aicher WK, Yamamoto M, DiFabio S, et al. Gingival mononuclear cells from chronic inflammatory periodontal tissues produce interleukin (IL)-5 and IL-6 but not IL-2 and IL-4. *Am J Pathol*. 1993; 142(4): 1239-50.
11. Gonzales JR, Mann M, Stelzig J, Bodeker RH, Meyle J. Single-nucleotide polymorphisms in the IL-4 and IL-13 promoter region in aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(6): 473-9.
12. Han YJ, Ma SF, Wade MS, Flores C, Garcia JG. An intronic MYLK variant associated with inflammatory lung disease regulates promoter activity of the smooth muscle myosin light chain kinase isoform. *J Mol Med (Berl)*. 2012; 90(3): 299-308.
13. Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005; 32 Suppl 6: 196-209.
14. Holla LI, Fassmann A, Augustin P, Halabala T, Znojil V, Vanek J. The association of interleukin-4 haplotypes with chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodontol*. 2008; 79(10): 1927-33.

15. Kamma JJ, Giannopoulou C, Vasdekis VG, Mombelli A. Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(10): 894-902.
16. Le Beau MM, Lemons RS, Espinosa R, 3rd, Larson RA, Arai N, Rowley JD. Interleukin-4 and interleukin-5 map to human chromosome 5 in a region encoding growth factors and receptors and are deleted in myeloid leukemias with a del(5q). *Blood.* 1989; 73(3): 647-50.
17. Loos BG, Leppers-Van de Straat FG, Van de Winkel JG, Van der Velden U. Fcgamma receptor polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(7): 595-602.
18. Manhart SS, Reinhardt RA, Payne JB, Seymour GJ, Gemmell E, Dyer JK, et al. Gingival cell IL-2 and IL-4 in early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 1994; 65(9): 807-13.
19. Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet.* 2006; 15 Spec No 1: R17-29.
20. Michalowicz BS, Ronderos M, Camara-Silva R, Contreras A, Slots J. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. *J Periodontol.* 2000; 71(6): 981-8.
21. Michel J, Gonzales JR, Wunderlich D, Diete A, Herrmann JM, Meyle J. Interleukin-4 polymorphisms in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28(5): 483-8.

22. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997; 14: 216-48.
23. Rodriguez-Jato S, Nicholls RD, Driscoll DJ, Yang TP. Characterization of cis- and trans-acting elements in the imprinted human SNURF-SNRPN locus. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(15): 4740-53.
24. Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, Inamura H, Mascali JJ, Klinnert M, et al. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy*. 1995; 25 Suppl 2: 74-8; discussion 95-6.
25. Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, Kiyono H, Smith FW, Beck JD, et al. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontal Res*. 1998; 33(4): 212-25.
26. 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(4): 341-5.
27. Shapira L, van Dyke TE, Hart TC. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. *Med Hypotheses*. 1992; 39(4): 319-22.
28. Shen X, Yan X, Xie B, Xu D, Wang K, Zhu J, et al. Genetic variants of interleukin-4 gene in autoimmune thyroid diseases: an updated meta-analysis. *Autoimmunity*. 2015; 48(2): 129-35.

29. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2000; 275(24): 18138-44.
30. Tsai CC, Ku CH, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med Sci.* 2007; 23(1): 1-7.
31. Vergnes JN, Arrive E, Gourdy P, Hanaire H, Rigalleau V, Gin H, et al. Periodontal treatment to improve glycaemic control in diabetic patients: study protocol of the randomized, controlled DIAPERIO trial. *Trials.* 2009; 10: 65.
32. Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, McGhee JR, Van Dyke TE, Kiyono H. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res.* 1997; 32(1 Pt 2): 115-9.