



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 ANOZZI

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. Ticiania 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, Lívia, 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.

2 PROPOSIÇÃO

Proposição Geral

Investigar a funcionalidade dos haplótipos TCI/CCI e TTD/CTI no gene *IL4*.

Proposições específicas

Publicação 1: Functionality investigation of the Interleukin 4 haplotypes assessed by blood cells of patients and GFP gene reporter constructs

Investigar a funcionalidade dos haplótipos no gene *IL4* para verificar sua influência na resposta imune frente a estímulos inflamatórios simulando in vitro eventos patológicos relacionados a doenças inflamatórias. A funcionalidade dos haplótipos arranjados como genótipos (TCI/CCI ou TTD/CTI) foi avaliada utilizando células do sangue de pacientes com tal carga genética; enquanto cada haplótipo como alelo (ex: TCI) foi avaliada por plasmídeos construídos artificialmente.

Publicação 2: Functional haplotypes in *Interleukin 4* gene associated with periodontitis

Determinar in vitro a funcionalidade de haplótipos no gene *IL4* previamente associados com a periodontite crônica, para que a partir de células coletadas do sangue de pacientes com os diferentes haplótipos, após estímulos com bactérias periodontopatogênicas, sejam investigadas possíveis diferenças na resposta imune. Este desenho experimental in vitro pretende simular eventos patológicos naturais relacionados à doença periodontal.

3 PUBLICAÇÃO 1

Functionality investigation of the Interleukin 4 haplotypes assessed by blood cells of patients and GFP gene reporter constructs *

Giovana Anovazzi^{*}, Marcell C. de Medeiros^{*}, Suzane C. Pigossi^{*}, Livia S Finoti^{*},
Tatiana Maria De Souza Moreira[€], Marcia P. A. Mayer[†], Cleslei Fernando Zanelli[€],
Sandro Roberto Valentini[€], Carlos Rossa Junior^{*}, Raquel M. Scarel-Caminaga[‡]

* Department of Oral Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, UNESP- Univ Estadual Paulista, SP, Brazil;

€ Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Univ Estadual Paulista - UNESP, Araraquara 14801-902, SP, Brazil

† Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

‡ Department of Morphology, School of Dentistry at Araraquara, UNESP- Univ Estadual Paulista, SP, Brazil.

Keywords: gene polymorphism, gene expression, polymorphism functionality, immunology, cytokine, functional analysis.

***Correspondence:** Dr. Raquel M. Scarel Caminaga. UNESP- Univ Estadual Paulista, School of Dentistry in Araraquara, Department of Morphology. CP. 331, CEP 14801-903, Araraquara, SP, Brazil. E-mail: raquel@foar.unesp.br

* Normas Genes and Immunity

Abstract

Differences in cytokine levels can be attributed to polymorphisms in their respective genes. We identified the CTI/TTD haplotype (Hap-1) and TCI/CCI haplotype (Hap-2) in the *IL4* gene formed by the -590(T/C), +33(T/C) and VNTR (indel) polymorphisms in association with chronic periodontitis. The aim of this study was to use the blood cells of patients with these *IL4* haplotypes to investigate differences in the immune responses against inflammatory stimuli and to assess the transcriptional effect of each haplotype in constructed plasmids. Peripheral blood was collected from 5 patients with the Hap-1 or Hap-2 haplotype, and cells were challenged with inflammatory stimuli to evaluate gene expression (RT-qPCR), secreted proteins (multiplex) and intracellular proteins to characterize the cells' phenotypic profile (flow cytometry). After utilizing site-directed mutagenesis to obtain constructs containing a specific *IL4* haplotype, each was transiently transfected into JM cells, and the functionality of the haplotypes was assessed by the GFP (green fluorescent protein) reporter gene expression using flow cytometry. We found higher anti-inflammatory *IL4* mRNA and protein levels in the Hap-1 that also presented higher levels of IL-1RA cytokines. Conversely, the Hap-2 haplotype showed higher levels of pro-inflammatory cytokines, such as TNF-A, IL-8 and IFN-G. Moreover, independent of the stimuli, the highest transcriptional activity was found for the GFP construct containing the CTI haplotype, while the lowest was driven by the *IL4* polymorphism in the promoter region. In conclusion, the different *IL4* haplotypes trigger opposite immune responses; these are anti-inflammatory (Hap-1) and pro-inflammatory (Hap-2). Additionally, the CTI haplotype accounts for the highest GFP transcriptional activity in comparison with the other haplotypes.

Introduction

DNA polymorphisms are ubiquitous genetic variations among individuals and include single nucleotide polymorphisms (SNPs), insertions and deletions (indels), and other larger rearrangements¹. They differ from mutations because of their higher frequency in the general population (>1%). Gene polymorphisms may cause significant changes in function by altering the levels or activities of their specific proteins². The relationships between polymorphisms in immune system genes and multifactorial disease have been reviewed previously³. Moreover, differences in cytokine levels have been attributed to polymorphisms in their respective genes, as demonstrated by interleukin 1 (IL-1)⁴, IL-10^{5,6}, IL-6⁷ and IL-4⁸.

In the immune response, one of the most relevant cytokines is the interleukin 4 (IL-4) because it is a potent down-regulator of macrophage function that inhibits the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6 and tumour necrosis factor (TNF). Moreover, after stimulation, IL-4 acts as a mitogen of B cells and enhances the secretion of immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin E (IgE)⁹. Auxiliary T lymphocyte (Th1) cells produce mainly interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-2 (IL-2), which promote cell-mediated immunity, whereas Th2 cells, which secrete IL-4, IL-10 and IL-13, are associated with humoral immune responses and induce antibody production¹⁰. Th1 and Th2 responses are largely mutually antagonistic and tend to down-regulate each other³. The Th2 anti-inflammatory cytokine IL-4 is coded by the *IL4* gene, which comprises four exons and is approximately 10kb in size (GenBank accession n^o. M23442). The gene is located on chromosome 5q31.1¹¹ together with other cytokine Th2 genes, such as IL-3, -5, -9, -13 and -15¹². IL-4 carries instructive signals to the T-cell nucleus through a series

of intermediate molecules. First, the IL-4 receptor stimulates STAT6 in the naïve T cell¹³. The phosphorylated dimeric STAT6, in the context of a fully activated T cell, efficiently increases the expression of GATA3 from a low to high level. At some point, feedback of transcriptional autoactivation stabilizes GATA3 expression^{14 15}.

Polymorphisms in the *IL4* gene have been investigated in a variety of diseases, including asthma^{16, 17}, multiple sclerosis^{18, 19}, lupus erythaematosus²⁰, rheumatoid arthritis^{21;22}, preeclampsia^{23, 24}, coronary artery disease^{25, 26}, gastric cancer^{27, 28}, colorectal cancer²⁹ and diabetes mellitus^{30;31}. When a genetic analysis investigates an individual polymorphism, it may not detect an association with a disease, as occurred when the -590 (SNP) in the *IL4* gene polymorphism was examined for an association with chronic periodontitis (CP) in a Brazilian population³². However, when the genetic analysis includes the additional influence of various polymorphisms in linkage disequilibrium (instead of one individual polymorphism), the potential genetic basis for disease is more robust³³. There are three polymorphisms whose physical proximity on the chromosome in the *IL4* gene produce strong or perfect linkage disequilibrium, and they consequently form haplotypes³⁴⁻³⁶. When we investigated a larger Brazilian population focusing on *IL4* polymorphisms arranged as haplotypes, we found a significant association with CP³⁷. The haplotype formed by the -590(T/C; promoter region, rs2243250), +33(C/T, 5'UTR region or -34 counted from the start codon; rs2070874) and VNTR (variable number of tandem repeats; insertion/deletion of 70 bp in intron 3, or indel, rs2234665) polymorphisms in the *IL4* gene (Figure 1A) was associated with asthma³⁸ and multiple sclerosis³⁶. Other polymorphism combinations forming other *IL4* haplotypes have been investigated in

relation to CP³⁹ and other diseases such as chronic obstructive pulmonary disease³⁵ and common variable immunodeficiency⁴⁰.

Studies investigating the biological functionality of these haplotypes are necessary in order to understand how patients' genetic characteristics influences the pathogenesis of disease. Despite the functional role of polymorphisms in the *IL4* gene, as individuals (e.g., the -590 SNP⁴¹) or arranged as haplotypes^{42;8}, study results have been influenced by the different study designs. The mRNA and protein levels are modulated by the types of cultured cells and also by their microenvironment, including stimulatory or costimulatory signals⁴³. Therefore, the present study aimed to investigate the biological functionality of the *IL4* haplotypes by assessing their influence on gene expression, cytokine production and immune cell polarization utilizing blood cells from patients with different genetic markers, as well as artificially constructed recombinant plasmids. In other words, based on the importance of IL-4 in the inflammatory process, we investigate whether there are differences in the immune responses against inflammatory stimuli modulated by *IL4* haplotypes at transcriptional and post-transcriptional levels in order to understand how genetic variation can modulate biological functions on a pathologic phenotype.

MATERIAL AND METHODS *

Patients

Individuals carrying the Hap-1 (n=5) or Hap-2 (n=5) *IL4* gene were confirmed by sequencing. The ethics committee was approved (CAAE 18527813.7.0000.5416).

* Apêndice A e B

Sample size calculation determined five subjects for a 95% power study, thus ten patients were recruited. Exclusion criteria were: use of antibiotics, anti-inflammatory or corticoids in the four last months, smoking, history of systemic or local disease with influence on the immune system, current pregnancy or lactation.

Gene Expression Assay

Peripheral blood from the patients was drawn into a vacutainer blood-collecting tube (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) with EDTA/K3. Separation of nucleated cells was performed by a double gradient of Histopaque (Sigma Chemical). After initial separation of neutrophils and PBMCs, monocytes and lymphocytes were isolated from other PBMCs using negative selection magnetic bead-based sorting (Dynabeads untouched human monocytes kit; Dynabeads untouched human T cells kit - Invitrogen). After separation, all cells were cultured overnight in RPMI 1640 supplemented with 1% heat-inactivated FBS. Lymphocytes were activated with CD3/CD28 antibodies (Dynabeads Human T-Activator, Life Technologies) for 7 hours. After activation, concentration of cells was adjusted to 5×10^5 cells/mL for the 4-hour stimulation (period established from pilot study) with with 50 ng/mL of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA - Sigma-Genosys) in addition to 500 ng/mL of ionomycin calcium salt (I) (Sigma) or 5 ng/mL of interleukin-1 β (IL-1 β) or medium only (control). Total RNA was extracted using an affinity column system including treatment to eliminate possible genomic DNA contaminants (RNAqueous kit, Ambion Inc., Austin, TX). RNA was quantitated on a microvolume spectrophotometer (NanoView, GE Healthcare, Munich, Germany) and 300 ng were used for cDNA synthesis using random

hexamer primers and reverse transcriptase (High Capacity cDNA Archive kit, Applied Biosystems). Real-time PCR was performed using TaqMan assays (Applied Biosystems) and pre-designed and optimized sets of primers and probe (Gene expression assays, Applied Biosystems) for detection of *IL4*, *IL8*, *IL12*, *TNFA*. Expression of *GAPDH* was used as the endogenous control. The data was analyzed as relative changes to unstimulated controls by the DDCT method using the thermocycler's software (StepOne Plus, Applied Biosystems). Because of these stimulation/non-stimulation conditions were applied to blood cells from the same patient, normalization was performed for each patient. Therefore, mean values of the relative gene quantification were obtained for each Hap-1 and Hap-2 group.

Cytokine production

Equal volumes of whole blood containing 1×10^6 PBMCs and RPMI 1640 supplemented with 20% heat-inactivated FBS were combined and immediately stimulated PMA+Ionomycin for 12 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The levels of selected candidate proteins: GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, MIP-1 β (macrophage inflammatory protein-1 β), eotaxin, RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), MIG (monokine induced by gamma interferon), IL-12 (p40/p70), IL-8, IL-17, MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 alpha), IL-10, IL-1RA, IFN- γ , IL-13, MCP-1, IL-7, IL-15, IFN- α , IL-2R, IP-10, IL-5, and IL-2, in whole blood were measured using a bead-based multiplex assay (Human Cytokine 25-Plex Panel, cat#LHC0009, Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The experiments were performed and analysed in duplicate.

Immunophenotyping

Equal volumes of whole blood containing 1×10^6 PBMCs and RPMI 1640 supplemented with 20% heat-inactivated FBS were combined and immediately stimulated with PMA+Ionomycin for 72 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Non-attached cells were collected by centrifugation (400 g, 5 min, RT), counted and adjusted to 1×10^6 cells/mL. After stimulation, samples were collected, and the erythrocytes were lysed (FACS Lysing Solution, BD Biosciences). These samples were then separated in three aliquots and two aliquots were stained for CD4/PeCy7 (T helper cell marker; BD Biosciences) and the remaining aliquot stained for CD14/PeCy7 (monocyte marker; BD Biosciences) for 30 minutes in the dark. Cells in both aliquots were permeabilized with saponin-containing buffer (Cytoperm, BD Biosciences) for 15 minutes. The two CD4-stained aliquots were subsequently stained for IFN γ -FITC/IL-4 PE or for IL-17 PE/FoxP3-AlexaFluor488; whereas CD14-stained aliquots were stained for IL-12 FITC and IL-10 PE. Staining was performed for 40 minutes in the dark according to the manufacturer's instructions. Both unstained samples and isotype-control samples were prepared using the same protocol. Data was acquired with 488 nm laser excitation on a flow cytometer (FACSVerse, BD Biosciences) and analyzed using the cytometer's software (BD FACSuite, BD Biosciences).

Construction of *IL4* haplotypes in GFP reporter vector

Plasmid GFP reporter vectors (pAcGFP1-1, Clontech Lab. Inc.) were constructed by the GenScript Company such that the gene reporter expression (green fluorescent protein,

GFP) is under control of the proximal *IL4* promoter (1,18 kb fragment, GenBank # M23442.1, comprising the -590 and +33 SNPs). Moreover, due to the importance of investigating the potential functionality of the VNTR (indel) polymorphism in the third intron of the *IL4* gene, a 2.6kb sequence corresponding to this intron was inserted immediately after the coding sequence of the GFP reporter gene vector and before the poly-A site of the GFP reporter vector (pAcGFP1-1, Clontech Lab. Inc.) (Figure 1B). Han et al. used similar construction in 2012⁴⁴ to investigate the transcriptional effect of an intronic polymorphism in the *MYLK* gene.

-Site-Directed Mutagenesis

Two site-directed mutageneses were performed to obtain the CCI and CTI constructs (Table 1) from the TCI plasmid construct synthesized by GenScript. Primers were designed for these site-directed mutations (SnapGene software, Table 1). The PCR for site-directed mutagenesis was performed with Phusion kit (Biolabs) and the polymerization reaction was performed in thermocycler (GeneAmp® PCR System 9700 thermocycler, Applied Biosystems). The PCR product was transformed in competent *E. coli* DH5 α by thermal shock, and the plasmid purification was done with column-based Kit (QIAprep Spin Miniprep kit, QIAGEN) according to manufacturer's protocol. The plasmid DNA samples were quantitated in a spectrophotometer (NanoDrop 2000, ThermoFisher). The product was confirmed by sequencing (Big Dye® Terminator kit v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems). The quality and reliability of the sequenced products were checked (Sequence Scanner v 2.0 software, Applied Biosystems), and global multiple alignment was performed using the ClustalW2 and

compared to the original sequence (wild type, wt). Thus, the plasmid containing the CCI mutation was used for site-directed mutagenesis reaction to obtain the CTI mutation.

Transfection and GFP reporter assays

The plasmid containing only the promoter sequence of the *IL4* gene without the presence of SNPs +33(C/T) and VNTR (indel), referred to here as Promoter (P), the TCI and TTD plasmids (prepared by GenScript), and the CCI and CTI (mutagenized plasmids) were transiently transfected by electroporation/cationic reagents (Neon system, Invitrogen Corp) into the JM cells (human T lymphocytes), and the effects of the different haplotypes in the promoter and/or intron regions on the expression of GFP reporter gene were evaluated by flow cytometry. The JM cells in culture (2×10^7 cells/mL) were transfected with 10 μ g of plasmid and the parameters used were voltage: 1350 V, time: 10ms and pulse: 3. After transfection, cells were incubated with RPMI 1840 medium supplemented with 10% FBS. Stimuli with PMA/Ionomycin, IL-1 β , and IL-4 with anti-IL-12 (to induce polarization towards the Th2 phenotype) were performed 24 hours after the transfection procedure, and the results of GFP expression were assessed by flow cytometry after 24 hours. The results were obtained in three independent experiments performed in triplicate for each stimulus.

Statistical Analysis

To compare the outcomes of interest according to the *IL4* haplotypes, ANOVA and the unpaired T-test were performed utilizing the GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc.). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Individuals with the Hap-1 or Hap-2 in the *IL4* gene were confirmed by sequencing. The patients in the booth haplotypes had similar mean age (Hap-1: $42.8 \pm 11,0$ years standard deviation; Hap-2: 42.6 ± 10.4) and gender (4 female: 1 male in each group) ($p > 0.05$).

The mRNA expression levels of *IL4*, *IL8*, *IL12* and *TNF- α* by neutrophils, monocytes and lymphocytes are shown in Figure 2. The significantly higher expression levels of *IL4* in the Hap-1 group compared to the Hap-2 group were observed in neutrophils (Figure 2A), monocytes (Figure 2B) and lymphocytes (Figure 2C) for all performed stimuli. *IL4* gene expression with PMA/I or IL-1 β stimuli was similar in all cell types. *IL12* gene expression in monocytes was significantly higher in the Hap-2 group than in the Hap-1 group for both stimuli (Figure 2B). The highest gene expression was that of *IL8* in neutrophils and lymphocytes. The PMA/I and IL-1 β stimuli significant increased *IL8* mRNA production compared to control in the Hap-2 group compared to the Hap-1 group (Figures 2A, B, C). Similar results were found regarding the mRNA levels of the *TNFA* gene.

Whole Blood Cytokine Detection

Out of the 25 cytokines include in the assay, IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13 and IL-17 cytokines were not detected. In the inflammatory panel, we observed significantly increased levels of pro-inflammatory cytokines IL-8 and *TNF- α* in the Hap-2 group. There were no differences in the GM-CSF levels, and higher levels of IL-1RA were found in the Hap-1 group (Figure 3A). The Th2 profile represented by the IL-4 anti-inflammatory cytokine showed significantly higher levels in the Hap-1 group, while IFN-

γ was higher produced by the Hap-2 group (Figure 3B). Significantly higher levels of IFN- α and IL-12 were found in the Hap-2 group (Figure 3C). Regarding the Chemokine Panel, significantly higher levels were observed for chemokines: Eotaxin, IP-10, MIG, MIP-1 α and RANTES in the Hap-2 cells when stimulated by PMA/I (Figure 3D).

Polarization of Macrophages and T helper cells

In the M1 profile, we verified that the Hap-1 group had increased polarization compared to the Hap-2 haplotype (Figure 4B), but there was no significant difference between the *IL4* haplotypes for this cell profile (Figure 4C). Monocytes from Hap-2 patients showed significantly greater polarization towards the alternative phenotype M2 after stimulation (Figure 4D). The Hap-2 haplotype previously associated with susceptibility to CP showed significantly higher polarization towards pro-inflammatory Th1 and Th17 phenotypes after stimulation (Figure 4G,K). CD4⁺ cells from patients with the Hap-1 haplotype presented a significantly greater proportion of cells in the Th2 and Treg phenotypes (Figure 4H,L), indicating an overall anti-inflammatory or immunosuppressive response in this haplotype.

Transcriptional activity of each *IL4* haplotype constructs by GFP reporter gene

The promoter (P), TCI, TTD, CCI and CTI transiently transfected by electroporation/cationic reagents (Neon system Invitrogen Corp) in JM cells (human T lymphocytes) were stimulated with PMA+I, IL-1 β or with IL-4 and anti-IL-12. The GFP reporter gene expression was assessed after 24 hours of stimulus by flow cytometry. In general, we observed that the presence of the polymorphism in the promoter region (P) of

the *IL4* gene produced the lowest GFP fluorescence for all stimuli (Figure 5A, B, C). Moreover, in regard to the evaluation of the entire *IL4* haplotype, the CTI haplotype demonstrated the highest transcriptional activity of the GFP reporter gene than the other constructs with different haplotypes, as observed for all stimuli on JM cells (Figure 5A, B, C).

Discussion

To our knowledge, this is a complete functionality study of haplotypes in the *IL4* gene, and our study was not influenced by patients' age or gender because these characteristics were similar between groups. We investigated the *IL4* haplotype formed by the -590(T/C), +33(C/T) and VNTR (indel) polymorphisms on the transcriptional and post-transcriptional levels of intracellular and secreted proteins, as well as how the constructed haplotypes could impact gene expression, using blood donated by patients. The functionality of the same haplotype was investigated by Nakashima et al. in 2002⁴³, who analysed IL-4 expression in peripheral CD4 T cells using flow cytometry after stimulation by PMA+I; aliquots of whole blood from patients with TTD or CCI *IL4* haplotypes were used. They observed significantly higher IL-4 expression in TTD/TTD Th cells. Although the patients investigated here were heterozygous for this haplotype (CTI/TTD, Hap-1), we used similar methodology and verified significantly higher intracellular IL-4 expression related to this haplotype (Fig 2). Gonzales et al., (2010)⁸ observed higher *IL4* and *STAT6* mRNA levels, as well as IL-4 protein, in T CD4 cells of patients with -590TT and -34TT *IL4* genotypes. This finding agrees with the present study, as their patients had the *IL4* haplotype TT/TT (excluding the VNTR

polymorphism), and our patients had the CT/TT haplotype (part of Hap-1), which increased the *IL4* mRNA levels (Fig 2) and IL-4 protein (Fig 3B). Also in comparison with our study, Bartova et al. in 2014⁴² observed higher IFN- γ levels in PBMC of patients homozygous for -590CC and VNTR-II; considering the high linkage disequilibrium between these polymorphisms, these patients might have the C_I haplotype. In our study, we observed that the CCI haplotype was associated with higher production of IFN- γ , which could produce some similarity in these results.

The PMA+I stimulus performed here is a potent, polyclonal and nonspecific agent known to induce signalling and subsequent cytokine production. PMA is an analogue of diacylglycerol, a key mediator of multiple intracellular signalling pathways⁴⁵. Ionomycin stimulates Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum, activating Ca^{2+} -sensitive enzymes and synergizing with PMA^{46;47}. The main function of IL-1 β cytokine is to trigger pro-inflammatory reactions and induce the mRNA expression of hundreds of genes in multiple cell types⁴⁸. The results obtained for gene expression for all cell types were similar comparing the PMA+I and IL-1 β stimuli (Figure 2A, B, C); therefore, for the experiments that evaluated protein production (flow cytometry and multiplex), only the PMA+I stimulus was executed.

Macrophages (CD14+ cells) are a functionally heterogeneous cell population that is mainly shaped by a variety of microenvironmental stimuli. IFN- γ , IL-1 β and lipopolysaccharide (LPS) induce a classical activation of macrophages (M1), whereas IL-4 and IL-13 induce alternative activation (M2)⁴⁹. CD4 T-cells were initially subdivided into two subsets designated Th1 and Th2 on the basis of their pattern of cytokine production. As a general rule, immune responses mediated by T cells polarized into a

Th1-type phenotype are characteristically cellular and pro-inflammatory, while Th2 cells are associated with humoral immunity and anti-inflammatory properties^{50;13}. Moreover, CD4+ cell subtypes Th17 and Treg (regulatory T-cells) present antagonistic immunological roles as effector and suppressive cells, respectively^{51;52}.

The *IL8*, *IL12* and *TNFA* mRNA levels expressed in neutrophils, monocytes and lymphocytes were higher in the Hap-2 group, while *IL4* expression was higher in the Hap-1 group. IL-8, and TNF- α are innate pro-inflammatory cytokines and IL-12 is related with Th1 profile⁵³, while IL-4 is a Th2 characteristic cytokine. Whether the immune response will drive into Th1 or Th2 depends of the nature of the antigen, the degree of foreignness, the dose of the antigen and the time after immunization at which the Th1/Th2 phenotype of the immune response is assessed⁵⁴. Differences in the patient's genetic carriage (considering the *IL4* haplotypes) could lead to chromatin changes at the signature cytokine loci (IFN-gamma/Th1 and IL-4/Th2), which could interfere at the level of Th1/Th2 differentiation⁵⁵. Future studies could investigate possible regulatory factors responsible for gene regulation.

From an overall view, the analysis of secreted cytokines showed a difference in the modulation of pro- and anti-inflammatory signatures influenced by the carriage of Hap-1 or Hap-2 haplotypes. While Hap-1 had higher levels of anti-inflammatory cytokines (IL-1RA and IL-4), Hap-2 showed increased levels of pro-inflammatory cytokines/chemokines (TNF- α , IL-8, GM-CSF, IL-2R, IFN-gamma, IFN-alpha, IL-12 (p40/p70), IL-15, eotaxin, IP-10, MIG, MCP-1, MIP-1alfa, MIP-1 β and RANTES). This shows an exacerbated inflammatory profile related to the Th1 phenotype, and because of this, it is more related with autoimmune disorders⁵⁶. Thus, it seems that the Th1 signature

cytokines were characteristic of the Hap-2 haplotype, which makes patients with this haplotype susceptible to developing autoimmune diseases. Risk of multiple sclerosis (MS), an important chronic autoimmune disease, is associated with the presence of the CCI *IL4* haplotype³⁶, the same haplotype investigated here as part of the Hap-2 haplotype (TCI/CCI). Xiang. et al. in 2014 investigated rheumatoid arthritis (RA), another chronic inflammatory autoimmune disease, and found that the T allele of the *IL4* -590(C/T) polymorphism was significantly associated with susceptibility to RA in a Chinese population²¹. This was confirmed in an Egyptian population, where patients with -590TT showed increased RA risk and activity⁵⁷.

Polarization results reinforce the other presented findings because they showed that the Hap-2 haplotype drove a more pro-inflammatory response, as seen by greater polarization towards Th1, followed by the Th17 haplotype. Conversely, Hap-1 confirmed its association with an anti-inflammatory response due to greater polarization towards Th2 and Treg. However, considering the M1/M2 profile, Hap-2 showed a more anti-inflammatory phenotype by the overexpression of the M2.

The transcriptional activity of the independent plasmid constructs containing each specific haplotype (TCI, CCI, CTI, TTD) was evaluated by the GFP expression quantified by flow cytometry. For all the stimuli, we found significantly greater transcriptional activity of the CTI *IL4* haplotype, including 14-fold (stimulated with PMA+I), 2-fold (stimulated with IL-4 and anti-IL-12) and 1.5-fold (stimulated with IL-1B) activity compared to the expression driven by the plasmid containing only the -590 polymorphism in the promoter region (P). The functional study of a single polymorphism will not reveal the overall functional effect of the polymorphism in combination with

other polymorphisms⁵⁸. The most relevant result obtained by this in vitro assay is the demonstration of the effect of each haplotype on gene transcriptional activity. For example, we demonstrated that the CTI haplotype drove greater GFP reporting than TTD. However, because the natural consequences of gene expression are influenced by a combination of two haplotypes that are each located on each homologue chromosome, it is also important to investigate the functionality of haplotypes arranged as genotypes in order to assess the potential real-world impact of these haplotypes on transcriptional and translational levels. Because of this, we investigated the functionality of the CTI/TTD (Hap-1) or TCI/CCI (Hap-2) utilizing blood cells of patients challenged by inflammatory stimulus. Like that observed for *IL6* polymorphisms⁵⁸, the transcriptional activity of the *IL4* haplotypes is cell-type specific, which may be of physiological relevance when considering different disease processes. Moreover, another strength of our study is the investigation of the transcriptional effect of an intronic polymorphism. Despite increasing evidence regarding the intronic biological functionality (e.g., production of noncoding RNAs⁵⁹ and the presence of cis- and trans-acting elements regulating gene expression)⁶⁰, few studies have explored this^{44, 60}. To our knowledge, this is the first study to use properly constructed plasmids to investigate the transcriptional effect of the intronic polymorphism VNTR (indel) in the *IL4* gene.

In summary, our findings of mRNA and secreted intracellular protein production lead us to conclude that the different *IL4* haplotypes trigger opposite immune responses; anti-inflammatory and pro-inflammatory responses are associated with Hap-1 and Hap-2, respectively. Additionally, the CTI haplotype accounts for the highest transcriptional activity in comparison with the other haplotypes. Further studies might investigate the

affinity of regulatory proteins with these *IL4* haplotypes. The knowledge of how the patient's genetic carriage could influence the onset or the course of a disease could contribute to disease prevention and treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by State of São Paulo Foundation Research (FAPESP) grants #2013/17887-8 and #2014/04638-2. The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the author-ship and/or publication of this article.

Table 1. Site-directed mutations.

<i>IL4</i> Haplotypes	Mutation	Primers (5' – 3')
TCI	Wild #	-----
<u>CCI</u>	<u>T628C*</u>	<u>Forward:</u> GGAGAACATTGT <u>CCCC</u> CAGTGCTGG
		<u>Reverse:</u> CCAGCACTGGGG <u>G</u> ACAATGTTCTCC
<u>CTI</u>	C1184T*	<u>Forward:</u> CCTGATAAACTAATTGT <u>T</u> CTCACATTGTCCTGC
		<u>Reverse:</u> GCAGTGACAATGTGAG <u>A</u> CAATTAGTTTATCAGG
TTD	Wild #	-----

Construct synthesized by GenScript. * Mutation site from the first nucleotide of the cloned promoter. In bold and underlines are the mutated nucleotide by the site-directed mutagenesis reaction.

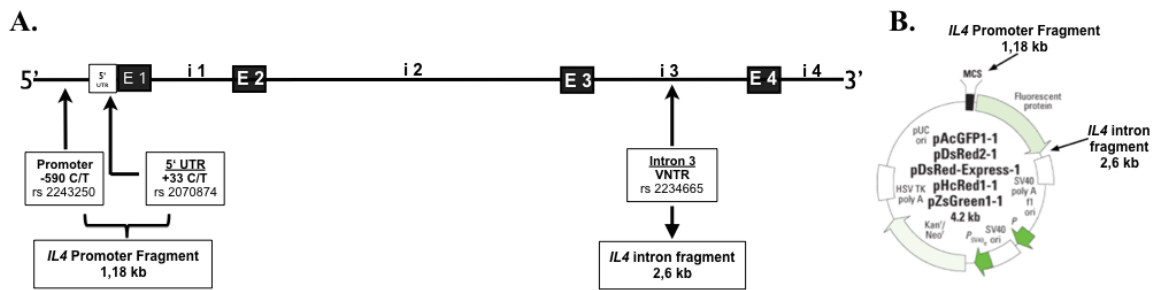


Figure 1. Schematic representation of the *IL4* gene and plasmid map (pAcGFP1-1 - Clontech). **A.** *IL4* gene with the following polymorphism positions: -590 (C/T) in the promoter, +33 (C/T) in the 5' UTR (near exon 1, E1) and VNTR (indel) in the intron 3 (i3). **B.** Map of the plasmid used for construction of the investigated *IL4* haplotype. Synthesized 1,18-kb sequence corresponding to *IL4* promoter (-1940 to +60 nucleotide) comprising the -590 and +33 SNPs was inserted upstream from the GFP (green fluorescent protein) reporter gene. Additionally, a synthesized 2.6-kb sequence corresponding to the third intron of *IL4* was inserted downstream of the reporter gene.

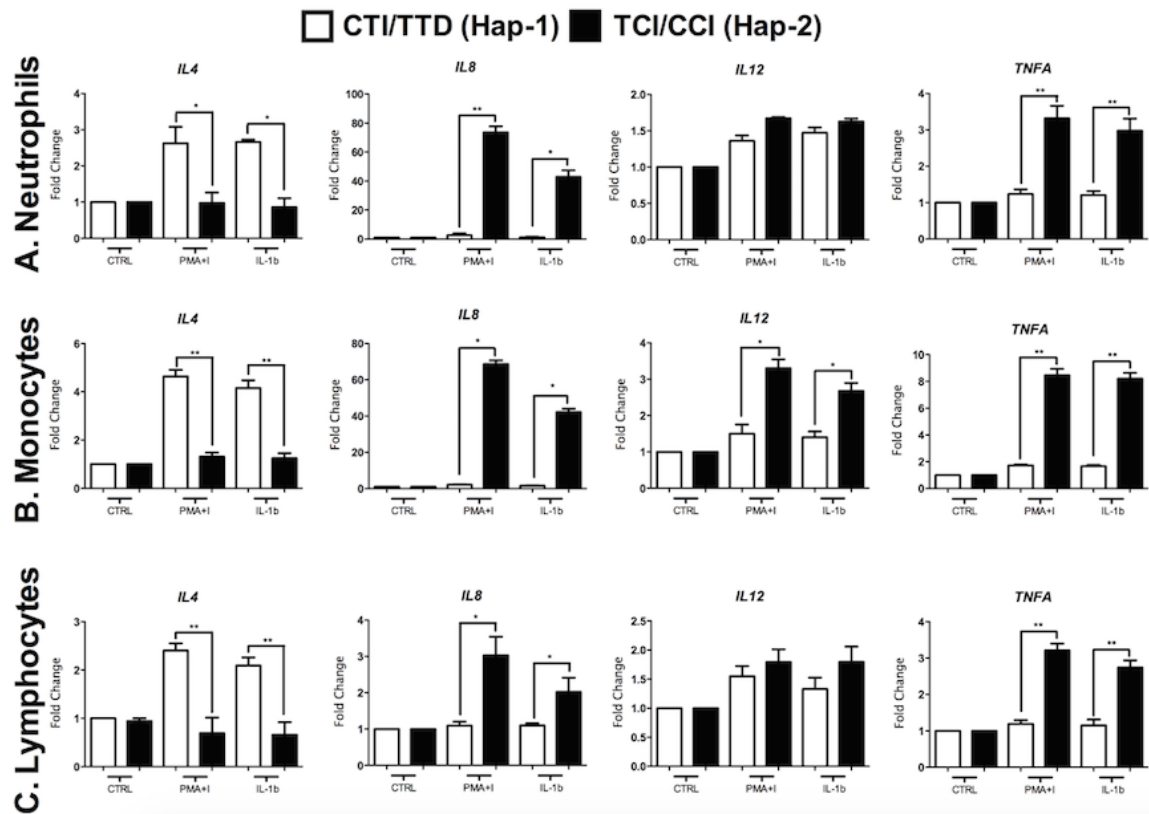


Figure 2. Gene expression of *IL4*, *IL8*, *IL12* and *TNFA* assessed in isolated cells from peripheral blood of patients with the CTI/TTD *IL4* (Hap-1) or TCI/CCI (Hap-2) haplotype after PMA+I or IL-1 β stimuli. The mRNA levels (normalized by *GAPDH*) are represented in fold change in: **A.** neutrophils; **B.** monocytes; **C.** lymphocytes. Mean values of the relative gene quantifications of the Hap-1 and Hap-2 groups are represented in columns, and bars show standard deviations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

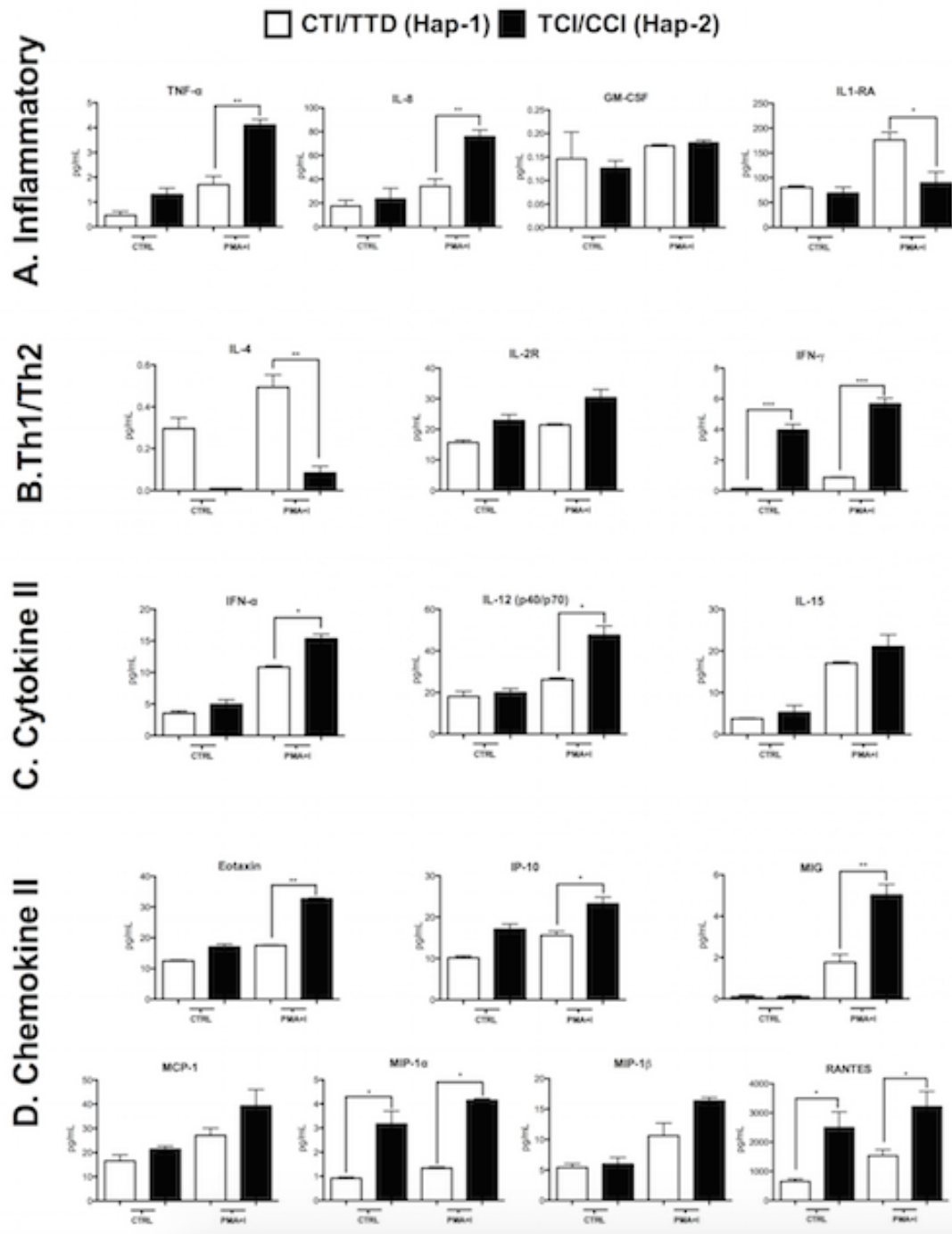


Figure 3. Protein concentration (pg/ml) analysed by multiplex from whole blood of patients with the CTI/TTD *IL4* (Hap-1) or TCI/CCI (Hap-2) haplotype after PMA+I stimulus. **A.** Inflammatory Panel; **B.** Th1/Th2 Panel; **C.** Cytokine II Panel; **D.** Chemokine II Panel. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

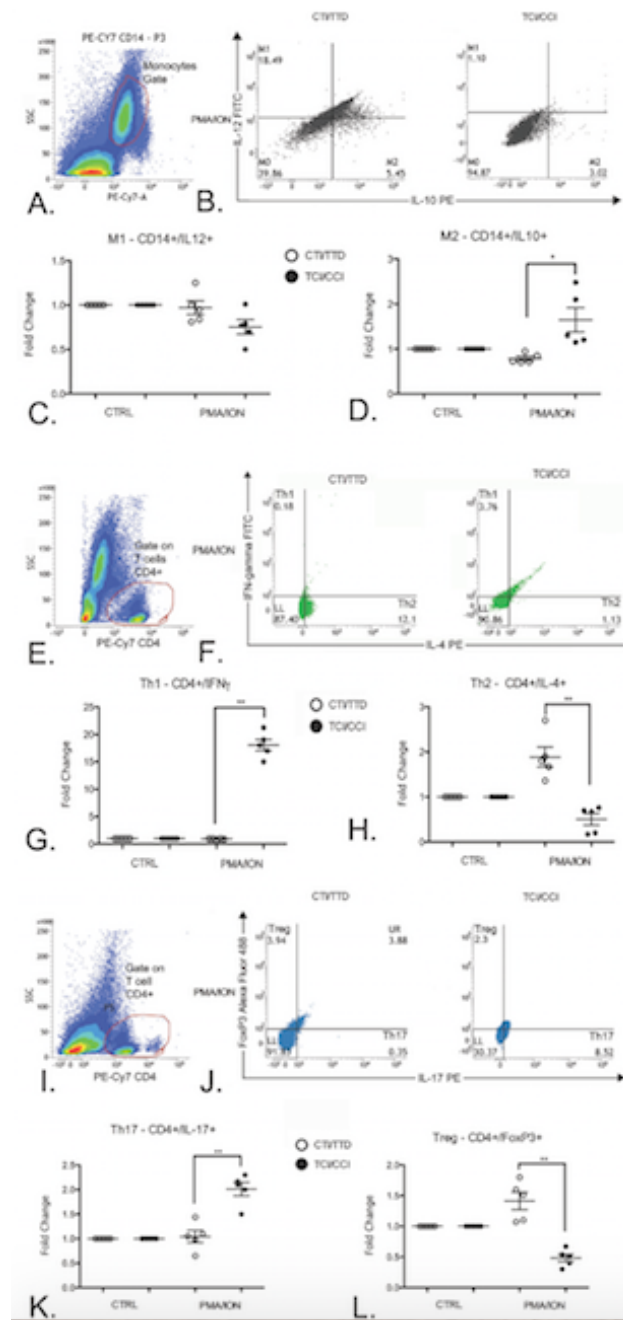


Figure 4. Cell phenotypic profile by flow cytometry from whole blood of patients with the CTI/TTD *IL4* (Hap-1) or TCI/CCI (Hap-2) haplotype after PMA+I stimulus. **A-D.** M1 and M2 monocytes; **E-H.** Th1 and Th2 lymphocytes; **I-L.** Th17 and Treg lymphocytes. **A, E, I.** specific cell gate; **B, F, J.** dot-blot representative of cells; **C, G, J.** and **D, H, L.** fold change of all patients from the investigated profile. T-test = * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

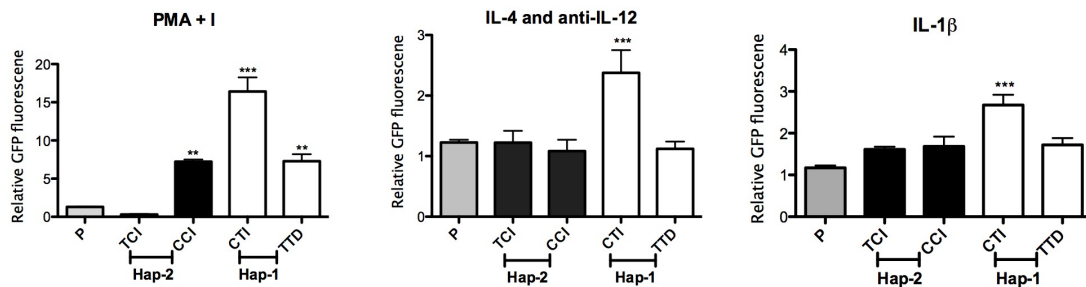


Figure 5. Transcriptional activity by GFP reporter gene of each *IL4* haplotype construct in comparison with the construct with only the polymorphism in the promoter (P) region of the *IL4* gene. JM cells were stimulated with: **A.** PMA+I; **B.** IL-4 and anti-IL-12; **C.** IL-1 β .

REFERENCES

1. Qi, J., Chen, Y., Copenhaver, G. P. & Ma, H. (2014). Detection of genomic variations and DNA polymorphisms and impact on analysis of meiotic recombination and genetic mapping. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 10007-12.
2. Stern, D. L. (2000). Evolutionary biology. The problem of variation. *Nature* **408**, 529, 531.
3. Vandebroek, K. & Goris, A. (2003). Cytokine gene polymorphisms in multifactorial diseases: gateways to novel targets for immunotherapy? *Trends Pharmacol Sci* **24**, 284-9.
4. Shirodaria, S., Smith, J., McKay, I. J., Kennett, C. N. & Hughes, F. J. (2000). Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res* **79**, 1864-9.
5. Turner, D., Grant, S. C., Yonan, N., Sheldon, S., Dyer, P. A., Sinnott, P. J. & Hutchinson, I. V. (1997). Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation* **64**, 776-9.

6. Crawley, E., Woo, P. & Isenberg, D. A. (1999). Single nucleotide polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region are not associated with renal disease or serology in Caucasian patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **42**, 2017-8.
7. Smith, A. J., D'Aiuto, F., Palmen, J., Cooper, J. A., Samuel, J., Thompson, S., Sanders, J., Donos, N., Nibali, L., Brull, D., Woo, P. & Humphries, S. E. (2008). Association of serum interleukin-6 concentration with a functional IL6 -6331T>C polymorphism. *Clin Chem* **54**, 841-50.
8. Gonzales, J. R., Groger, S., Haley, G., Bodeker, R. H. & Meyle, J. (2010). The interleukin-4 -34TT and -590TT genotype is correlated with increased expression and protein production in aggressive periodontitis. *Mol Immunol* **47**, 701-5.
9. Tew, J., Engel, D. & Mangan, D. (1989). Polyclonal B-cell activation in periodontitis. *J Periodontal Res* **24**, 225-41.
10. Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**, 145-73.
11. Arai, N., Nomura, D., Villaret, D., DeWaal Malefijt, R., Seiki, M., Yoshida, M., Minoshima, S., Fukuyama, R., Maekawa, M., Kudoh, J. & et al. (1989). Complete nucleotide sequence of the chromosomal gene for human IL-4 and its expression. *J Immunol* **142**, 274-82.
12. Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Espinosa, R., 3rd, Larson, R. A., Arai, N. & Rowley, J. D. (1989). 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* **73**, 647-50.
13. Murphy, K. M. & Reiner, S. L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 933-44.
14. Ouyang, W., Lohning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A. & Murphy, K. M. (2000). Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* **12**, 27-37.

15. Lee, H. J., Takemoto, N., Kurata, H., Kamogawa, Y., Miyatake, S., O'Garra, A. & Arai, N. (2000). GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *J Exp Med* **192**, 105-15.
16. Zhang, S., Li, Y. & Liu, Y. (2015). Interleukin-4 -589C/T Polymorphism is Associated with Increased Pediatric Asthma Risk: A Meta-Analysis. *Inflammation* **38**, 1207-12.
17. Birbian, N., Singh, J., Jindal, S. K. & Sobti, R. C. (2014). High risk association of IL-4 VNTR polymorphism with asthma in a North Indian population. *Cytokine* **66**, 87-94.
18. Kamali-Sarvestani, E., Nikseresht, A., Aflaki, E., Sarvari, J. & Gharesi-Fard, B. (2007). TNF-alpha, TNF-beta and IL-4 gene polymorphisms in Iranian patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* **115**, 161-6.
19. Quirico-Santos, T., Suppiah, V., Heggarty, S., Caetano, R., Alves-Leon, S. & Vandebroek, K. (2007). Study of polymorphisms in the interleukin-4 and IL-4 receptor genes in a population of Brazilian patients with multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* **65**, 15-9.
20. Mahmoudi, M., Tahghighi, F., Ziaee, V., Harsini, S., Rezaei, A., Soltani, S., Sadr, M., Moradinejad, M. H., Aghighi, Y. & Rezaei, N. (2014). Interleukin-4 single nucleotide polymorphisms in juvenile systemic lupus erythematosus. *Int J Immunogenet* **41**, 512-7.
21. Li, X., Chai, W., Ni, M., Xu, M., Lian, Z., Shi, L., Bai, Y. & Wang, Y. (2014). The effects of gene polymorphisms in interleukin-4 and interleukin-6 on the susceptibility of rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Biomed Res Int* **2014**, 265435.
22. Krabben, A., Wilson, A. G., de Rooy, D. P., Zhernakova, A., Brouwer, E., Lindqvist, E., Saxne, T., Stoeken, G., van Nies, J. A., Knevel, R., Huizinga, T. W., Toes, R., Gregersen, P. K. & van der Helm-van Mil, A. H. (2013). Association of genetic variants in the IL4 and IL4R genes with the severity of joint damage in rheumatoid arthritis: a study in seven cohorts. *Arthritis Rheum* **65**, 3051-7.

23. Salimi, S., Mohammadoo-Khorasani, M., Yaghmaei, M., Mokhtari, M. & Moossavi, M. (2014). Possible association of IL-4 VNTR polymorphism with susceptibility to preeclampsia. *Biomed Res Int* **2014**, 497031.
24. Gebhardt, S., Bruiners, N. & Hillermann, R. (2009). A novel exonic variant (221delT) in the LGALS13 gene encoding placental protein 13 (PP13) is associated with preterm labour in a low risk population. *J Reprod Immunol* **82**, 166-73.
25. Basol, N., Celik, A., Karakus, N., Ozturk, S. D. & Yigit, S. (2014). The evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene I/D and IL-4 gene intron 3 VNTR polymorphisms in coronary artery disease. *In Vivo* **28**, 983-7.
26. Seitz, H. K. & Homann, N. (2007). The role of acetaldehyde in alcohol-associated cancer of the gastrointestinal tract. *Novartis Found Symp* **285**, 110-9; discussion 119-4, 198-9.
27. Sun, Z., Cui, Y., Jin, X. & Pei, J. (2014). Association between IL-4 -590C>T polymorphism and gastric cancer risk. *Tumour Biol* **35**, 1517-21.
28. Bhayal, A. C., Krishnaveni, D., Rao, K. P., Kumar, A. R., Jyothy, A., Nallari, P. & Venkateshwari, A. (2015). Significant Association of Interleukin4 Intron 3 VNTR Polymorphism with Susceptibility to Gastric Cancer in a South Indian Population from Telangana. *PLoS One* **10**, e0138442.
29. Li, Q., Wang, Q., Xu, X., Ren, S. & Wang, L. (2014). Association between IL-4 -589C>T polymorphism and colorectal cancer risk. *Tumour Biol* **35**, 2675-9.
30. Rimon, R., Ahokas, A., Ruutiainen, J. & Halonen, P. (1986). Myelin basic protein antibodies in catatonic schizophrenia. *J Clin Psychiatry* **47**, 26-8.
31. Basol, N., Inanir, A., Yigit, S., Karakus, N. & Kaya, S. U. (2013). High association of IL-4 gene intron 3 VNTR polymorphism with diabetic peripheral neuropathy. *J Mol Neurosci* **51**, 437-41.
32. Scarel-Caminaga, R. M., Trevilatto, P. C., Souza, A. P., Brito, R. B., Jr. & Line, S. R. (2003). Investigation of IL4 gene polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol* **30**, 341-5.

33. Kinane, D. F. & Hart, T. C. (2003). Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* **14**, 430-49.
34. Suzuki, I., Yamaguchi, E., Hizawa, N., Itoh, A. & Kawakami, Y. (1999). A new polymorphism in the 5' flanking region of the human interleukin (IL)-4 gene. *Immunogenetics* **49**, 738-9.
35. van der Pouw Kraan, T. C., Kucukaycan, M., Bakker, A. M., Baggen, J. M., van der Zee, J. S., Dentener, M. A., Wouters, E. F. & Verweij, C. L. (2002). Chronic obstructive pulmonary disease is associated with the -1055 IL-13 promoter polymorphism. *Genes Immun* **3**, 436-9.
36. Kantarci, O. H., Schaefer-Klein, J. L., Hebrink, D. D., Achenbach, S. J., Atkinson, E. J., McMurray, C. T. & Weinshenker, B. G. (2003). A population-based study of IL4 polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **137**, 134-9.
37. Anovazzi, G., Kim, Y. J., Viana, A. C., Curtis, K. M., Orrico, S. R., Cirelli, J. A. & Scarel-Caminaga, R. M. (2010). Polymorphisms and haplotypes in the interleukin-4 gene are associated with chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Periodontol* **81**, 392-402.
38. Noguchi, E., Shibasaki, M., Arinami, T., Takeda, K., Yokouchi, Y., Kawashima, T., Yanagi, H., Matsui, A. & Hamaguchi, H. (1998). Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* **28**, 449-53.
39. Holla, L. I., Fassmann, A., Augustin, P., Halabala, T., Znojil, V. & Vanek, J. (2008). The association of interleukin-4 haplotypes with chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodontol* **79**, 1927-33.
40. Rezaei, N., Aghamohammadi, A., Mahmoudi, M., Shakiba, Y., Kardar, G. A., Mahmoudi, M., Moradi, B. & Amirzargar, A. A. (2010). Association of IL-4 and IL-10 gene promoter polymorphisms with common variable immunodeficiency. *Immunobiology* **215**, 81-7.
41. Rosenwasser, L. J., Klemm, D. J., Dresback, J. K., Inamura, H., Mascali, J. J., Klinnert, M. & Borish, L. (1995). Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* **25 Suppl 2**, 74-8; discussion 95-6.

42. Bartova, J., Linhartova, P. B., Podzimek, S., Janatova, T., Svobodova, K., Fassmann, A., Duskova, J., Belacek, J. & Holla, L. I. (2014). The effect of IL-4 gene polymorphisms on cytokine production in patients with chronic periodontitis and in healthy controls. *Mediators Inflamm* **2014**, 185757.
43. Nakashima, H., Miyake, K., Inoue, Y., Shimizu, S., Akahoshi, M., Tanaka, Y., Otsuka, T. & Harada, M. (2002). Association between IL-4 genotype and IL-4 production in the Japanese population. *Genes Immun* **3**, 107-9.
44. Han, Y. J., Ma, S. F., Wade, M. S., Flores, C. & Garcia, J. G. (2012). 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)* **90**, 299-308.
45. Matthews, S. A. & Cantrell, D. A. (2009). New insights into the regulation and function of serine/threonine kinases in T lymphocytes. *Immunol Rev* **228**, 241-52.
46. Chatila, T., Silverman, L., Miller, R. & Geha, R. (1989). Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol* **143**, 1283-9.
47. Oh-hora, M. (2009). Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. *Immunol Rev* **231**, 210-24.
48. Weber, A., Wasiliew, P. & Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal* **3**, cm1.
49. Zhu, L., Zhao, Q., Yang, T., Ding, W. & Zhao, Y. (2015). Cellular metabolism and macrophage functional polarization. *Int Rev Immunol* **34**, 82-100.
50. Jankovic, D., Liu, Z. & Gause, W. C. (2001). Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* **22**, 450-7.
51. Weaver, C. T. & Hatton, R. D. (2009). Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol* **9**, 883-9.
52. Appay, V., van Lier, R. A., Sallusto, F. & Roederer, M. (2008). Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* **73**, 975-83.
53. Bourke, C. D., Nausch, N., Rujeni, N., Appleby, L. J., Mitchell, K. M., Midzi, N., Mduluzi, T. & Mutapi, F. (2013). Integrated analysis of innate, Th1, Th2, Th17,

- and regulatory cytokines identifies changes in immune polarisation following treatment of human schistosomiasis. *J Infect Dis* **208**, 159-69.
54. Bretscher, P. A. (2014). On the mechanism determining the TH1/TH2 phenotype of an immune response, and its pertinence to strategies for the prevention, and treatment, of certain infectious diseases. *Scand J Immunol* **79**, 361-76.
 55. Fields, P. E., Kim, S. T. & Flavell, R. A. (2002). Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J Immunol* **169**, 647-50.
 56. Damsker, J. M., Hansen, A. M. & Caspi, R. R. (2010). Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci* **1183**, 211-21.
 57. Hussein, Y. M., El-Shal, A. S., Rezk, N. A., Abdel Galil, S. M. & Alzahrani, S. S. (2013). Influence of interleukin-4 gene polymorphisms and interleukin-4 serum level on susceptibility and severity of rheumatoid arthritis in Egyptian population. *Cytokine* **61**, 849-55.
 58. Terry, C. F., Loukaci, V. & Green, F. R. (2000). Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* **275**, 18138-44.
 59. Bass, B. L. (2002). RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu Rev Biochem* **71**, 817-46.
 60. Rodriguez-Jato, S., Nicholls, R. D., Driscoll, D. J. & Yang, T. P. (2005). Characterization of cis- and trans-acting elements in the imprinted human SNURF-SNRPN locus. *Nucleic Acids Res* **33**, 4740-53.

4 PUBLICAÇÃO 2

Functional haplotypes in *Interleukin 4* gene associated with periodontitis*

Giovana Anovazzi*, Marcell C. de Medeiros*, Suzane C. Pigossi*, Livia S. Finoti*,
Marcia P. A. Mayer†, Carlos Rossa Junior*, Raquel M. Scarel-Caminaga‡

* Department of Oral Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, UNESP-
Univ Estadual Paulista, SP, Brazil;

† Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São
Paulo, São Paulo, Brazil;

‡ Department of Morphology, School of Dentistry at Araraquara, UNESP- Univ Estadual
Paulista, SP, Brazil.

Key Words: polymorphism; gene expression; interleukin-4; cytokines; periodontitis;
genetics

Correspondence: Dr. Raquel M. Scarel-Caminaga. UNESP- Universidade Estadual
Paulista, School of Dentistry at Araraquara, Department of Morphology. CP. 331, CEP
14801-903, Araraquara, SP, Brazil. E-mail: raquel@foar.unesp.br

* Artigo submetido para Journal of Dental Research

Abstract

Chronic periodontitis (CP) is an infectious inflammatory disease that affects the tooth-supporting structures and in which dental plaque bacteria, immune mechanisms and genetic predisposition play important roles. Interleukin 4 (IL-4) is one of the key anti-inflammatory cytokines with relevant action in the balance of inflamed periodontal tissue. Individuals carrying the TCI/CCI (S-haplotype) in the *IL4* gene were 5 times more susceptible to CP, whilst the CTI/TTD (P-haplotype) conferred protection against CP. Patients with this P-haplotype produced higher levels of the IL-4 protein after non-surgical periodontal therapy compared with S-haplotype. The present in vitro study aimed to investigate the functionality of *IL4* haplotypes in immune cells to obtain insight into the influence of these genetic variations in the regulation of immune response to CP-associated bacteria. Peripheral blood was collected from 5 patients carrying each haplotype and the immune cells were challenged with periodontopathogens, comparing the responses of different haplotypes in regulation of gene expression, of protein secretion and on the immunophenotype of T helper responses. We found higher *IL4* mRNA and protein levels in P-haplotype, which also presented higher levels of anti-inflammatory cytokines; whereas cells from S-haplotype patients responded with higher levels of pro-inflammatory cytokines. S-haplotype had a significantly more pronounced polarization towards the Th1 phenotype, while P-haplotype was associated with an attenuated response to the periodontopathogens, with a suggestive skewing towards the Th2/M2 phenotypes. In conclusion, genetic variations associated with susceptibility or protection against chronic periodontitis are directly related with the influence on the response of immune cells to periodontopathogens.

INTRODUCTION

Chronic periodontitis (CP) is an inflammatory disease that results from an interaction between dental biofilm agents and the host immune response. There are a variety of host-related factors leading to a considerable variation among individuals in their risk for disease progression (Heitz-Mayfield 2005).

Periodontopathogens, such as *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), are highly prevalent in subgingival biofilms at periodontitis-affected sites (Byrne et al. 2009) and trigger an innate host response through Toll-like receptors (TLR) expressed by resident cells and leukocytes in the periodontal microenvironment (Mahanonda and Pichyangkul 2007). Activation of TLRs induces the production of inflammatory mediators (Gelani et al. 2009; Lima et al. 2010; Nakamura et al. 2008). These mediators are ultimately responsible for the establishment of a local immune response, which in chronic periodontitis, under the continued presence of periodontopathogens, consists predominantly of lymphocytes (T-cells) and macrophages (Gemmell et al. 2002).

The profiles of expression of host response genes influenced by intrinsic genetic variations are important determinants for susceptibility to periodontitis (Laine et al. 2001; Michalowicz 1994). In support to this rationale, differences in the levels of interleukins are attributed to polymorphisms in their encoding genes (Stern 2000), and genetic susceptibility to periodontal disease was demonstrated in association with variations in the genes of functional relevance in the immune response (Loos et al. 2005; Shapira et al. 2005).

We previously identified a haplotype formed by the -590(T/C; promoter region,

rs2243250), +33(C/T; 5'UTR region, rs2070874) and VNTR (variable number of tandem repeats; insertion/deletion of 70 bp in intron 3) polymorphisms in the *IL4* gene that conferred susceptibility to or protection against the development of CP. Individuals carrying the haplotype arranged as genotype TCI/CCI (S-haplotype) were five times more susceptible to CP ($OR_{adjusted} = 5.27$, 95% CI = 2.28-12.18), whilst those carrying the CTI/TTD (P-haplotype) seemed to be genetically protected from the development of periodontitis ($OR_{adjusted} = 0.29$, 95% CI = 0.08-0.88) (Anovazzi et al. 2010). Subsequent clinical studies have demonstrated that P-haplotype presents higher levels of IL-4 after 45 days of non-surgical periodontal therapy (Anovazzi et al. 2013), whilst S-haplotype, which was previously associated with genetic susceptibility to CP, is associated with increased levels of periodontopathogenic bacteria (Finoti et al. 2013).

Based on these findings from previous case-control and clinical studies, we decided to assess the functionality of these *IL4* haplotypes in the response of immune cells to periodontopathic bacteria. In this study we assess the influence of these *IL4* haplotypes on the regulation of gene expression, cytokine production and T helper-type polarization of peripheral blood cells in response to periodontopathogens.

MATERIAL AND METHODS *

Patients

Individuals carrying the S-haplotype or P-haplotype *IL4* gene were confirmed by

* Apêndice A e C

sequencing. The ethics committee was approved (CAAE 18527813.7.0000.5416)*. Sample size calculation determined five subjects for a 95% power study, thus ten patients (5 from each *IL4* haplotype) were recruited. Periodontal clinical examinations were performed on all patients and they were considered periodontal healthy (no sites with: PD >5mm or CAL >4mm and less than 2% of marginal bleeding on probing). Exclusion criteria were: history of subgingival periodontal debridement or periodontal surgery in the preceding 6 months, use of antibiotics, anti-inflammatory or corticoids in the four last months, smoking, history of systemic or local disease with influence on the immune system, current pregnancy or lactation.

Gene Expression

Peripheral blood from the patients was drawn into a vacutainer blood-collecting tube (Becton, Dickinson and Company) with EDTA/K3. Separation of nucleated cells was performed by a double gradient of Histopaque (Sigma Chemical). After initial separation of neutrophils and PBMCs, monocytes and lymphocytes were isolated from other PBMCs using negative selection magnetic bead-based sorting (Dynabeads untouched human monocytes kit; Dynabeads untouched human T cells kit, Invitrogen). After separation, all cells were cultured overnight in RPMI 1640 supplemented with 1% heat-inactivated FBS. Lymphocytes were activated with CD3/CD28 antibodies (Dynabeads Human T-Activator, Life Technologies) for 7 hours. After activation, concentration of cells was adjusted to 5×10^5 cells/mL for the 4-hour stimulation (period established from

* Anexo

pilot study) with viable *Pg*, *Aa* resuspended in medium or Control (same volume of medium used to resuspend bacteria). Bacterial stimulations were performed at a multiplicity of infection (MOI) of 100:1 (bacteria:cells). Total RNA was extracted using an affinity column system including treatment to eliminate possible genomic DNA contaminants (RNAqueous kit, Ambion Inc.). RNA was quantitated on a microvolume spectrophotometer (NanoView, GE Healthcare) and 300 ng were used for cDNA synthesis using random hexamer primers and reverse transcriptase (High Capacity cDNA Archive kit, Applied Biosystems). Real-time PCR was performed using TaqMan chemistry (TaqMan Fast Advanced Master Mix) and pre-designed and optimized sets of primers and probe (Gene expression assays, Applied Biosystems) for detection of *IL4*, *IL8*, *IL12*, *TNFA*. Expression of *GAPDH* was used as the endogenous control. The data was analyzed as relative changes to unstimulated controls by the DDCT method using the thermocycler's software (StepOne Plus, Applied Biosystems).

Cytokine production

Equal volumes of whole blood containing 1×10^6 PBMCs and RPMI 1640 supplemented with 20% heat-inactivated FBS were combined and immediately stimulated with heat-inactivated bacteria *Pg*, *Aa* (MOI: 100:1/ bacteria:cells) for 12 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The levels of selected candidate proteins in whole blood were measured using a bead-based multiplex assay (Human Cytokine 25-Plex Panel, cat#LHC0009, Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The experiments were performed and analysed in duplicate.

Immunophenotyping

Equal volumes of whole blood containing 1×10^6 PBMCs and RPMI 1640 supplemented with 20% heat-inactivated FBS were combined and immediately stimulated with viable *Pg*, *Aa* (MOI: 100:1 /bacteria:cells) for 72 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Non-attached cells were collected by centrifugation (400 g, 5 min, RT), counted and adjusted to 1×10^6 cells/mL. These samples were then separated in three aliquots and two aliquots were stained for CD4/PeCy7 (T helper cell marker; BD Biosciences) and the remaining aliquot stained for CD14/PeCy7 (monocyte marker; BD Biosciences) for 30 minutes in the dark. Cells in both aliquots were permeabilized with saponin-containing buffer (Cytoperm, BD Biosciences) for 15 minutes. The two CD4-stained aliquots were subsequently stained for IFN γ -FITC/IL-4 PE or for IL-17 PE/FoxP3-AlexaFluor488; whereas CD14-stained aliquots were stained for IL-12 FITC and IL-10 PE. Staining was performed for 40 minutes in the dark according to the manufacturer's instructions. Both unstained samples and isotype-control samples were prepared using the same protocol. Data was acquired with 488 nm laser excitation on a flow cytometer (FACSVerse, BD Biosciences) and analyzed using the cytometer's software (BD FACSuite, BD Biosciences).

Statistical Analysis

To compare the outcomes of interest according to the *IL4* haplotypes, ANOVA and the unpaired T-test were performed utilizing the GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc.). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Demographic profiles and periodontal status of the patients (Table 1) indicate that there were no differences between the groups in either aspect ($p > 0.05$).

Influence of IL4 haplotypes on cytokine gene expression in different immune cells

The expression levels of *IL4*, *IL8*, *IL12* and *TNFA* by neutrophils, monocytes and lymphocytes are shown in Figure 1. Neutrophils (Figure 1A), monocytes (Figure 1B) and lymphocytes (Figure 1C) of the P-haplotype expressed significantly higher levels of *IL4*, and *Pg* induced higher levels of *IL4* in neutrophils and lymphocytes.

IL12 gene expression by neutrophils and lymphocytes was reduced after bacterial stimulation, regardless of the haplotypes (Figure 1A,C). Interestingly, *IL12* expression by monocytes from S-haplotype patients was significantly greater in comparison with monocytes from P-haplotype patients (Figure 1B).

IL8 was the most prominently expressed of the selected candidate cytokine genes expressed by neutrophils and lymphocytes. Both *Pg* and *Aa* significantly induced *IL8* mRNA, which was greater in cells S-haplotype patients (Figure 1A-C).

TNFA gene expression was also induced by both *Pg* and *Aa*; however *Pg* was a more potent stimulus overall. There were statistically higher levels in S-haplotype for neutrophils, monocytes and lymphocytes (Figure 1).

Cytokine production in whole blood and the IL4 haplotypes

Out of the 25 cytokines included in the assay, IL-2, IL-5 and IL-17 were not detected. S-haplotype we observed increased levels of IL-1 β , IL-6, IL-8 and *TNF- α* pro-inflammatory cytokines. However, the IL-1RA receptor showed significantly higher levels in the P-haplotype for bacteria stimuli (Figure 2A).

Production of cytokines associated with Th1/Th2-type response suggests that stimulation with *Aa* and *Pg* results in a shift towards Th2 response, represented by increased levels of IL-4 and IL-10 in P-haplotype. In contrast, the same bacterial stimuli resulted in a possible skewing towards a Th1 response, as indicated by significantly greater levels of IFN- γ in the S-haplotype. Interestingly, IL-2R presented a differential regulation according to the nature of exogenous stimulation and haplotype: *Aa* stimulation resulted in higher production of IL-2R in the S-haplotype; whereas *Pg* stimulation induced higher levels of IL-2R in the P-haplotype (Figure 2B).

In Cytokine II Panel, we observed significantly higher levels of the IL-7, IL-15, and IL-12 in the S-haplotype for both bacterial stimuli. However, for the IFN- α , significant difference was observed with the *Pg* stimulus. Although there were higher IL-13 levels in the P-haplotype, the difference was not significant (Figure 3A).

Chemokines Eotaxin, IP-10, MIG, MCP-1, MIP-1 α and RANTES were all significantly higher in the S-haplotype in the presence of bacterial stimuli. Notably, *Aa* was more potent than *Pg* only in the induction of Eotaxin and IP-10, whereas MIG, MIP-1 α and RANTES were more potently induced by *Pg*. There were no significant differences for production of MIP-1 β (Figure 3B).

Polarization of monocytes and T helper cells

Monocytes from patients with P-haplotype were more prone to skewing towards an M1 activation profile after stimulation with *Aa* and *Pg*. Although, in general, a greater response was caused by stimulation with *Pg*, there was no significant difference between the haplotypes for IL-12^{high}/IL-10^{low} profile (Figure 4C). Monocytes from S-haplotype patients showed a significantly higher polarization towards the alternative activation phenotype M2 (IL-12^{low}/IL-10^{high}) after bacterial stimulation (Figure 4D). In agreement with a ‘pro-inflammatory’ skewing of immune cells from patients with the S-haplotype, CD4⁺ cells from these patients showed a significantly higher polarization towards pro-inflammatory Th1 and Th17 phenotypes after stimulation with both *Aa* and *Pg* for Th1, but only with *Aa* stimulation for Th17 (Figure 4G,K). Interestingly, stimulation with *Pg* induced a greater number of Th17 cells in the P-haplotype phenotype. CD4⁺ cells from patients with the P-haplotype presented a significantly greater proportion of cells in the Th2 and Treg phenotypes (Figure 4H,L), indicating an overall anti-inflammatory or immunosuppressive response in this haplotype.

DISCUSSION

Here, we investigated the functionality of haplotypes in the *IL4* gene in the response of immune cells to periodontopathic bacteria. Because of the homogeneity of demographic data of the patients carrying each haplotype and lack of difference in the periodontal clinical parameters, these characteristics were not variables of influence in this study.

P-haplotype showed higher mRNA expression of the *IL4* gene by bacterial-stimulated neutrophils, monocytes and lymphocytes, indicating that these genetic

variations are functional and increase the transcriptional activity of IL4 gene in immune cells. IL-4 levels in whole blood were also significantly higher in P-haplotype after stimulation with both *Aa* and *Pg*, suggesting a modulation of the whole immune response. This immunomodulatory effect is supported by the increased proportion of Th2 cells in the P-haplotype after stimulation with *Aa* and *Pg*. In agreement with our findings, the TTD *IL4* haplotype was previously associated with an increased production of IL-4 (Vandenbroeck and Goris 2003). In a Japanese population, haplotypes I (TTD/TTD), II (CCI/CCI) and I/II (TTD/CCI) were investigated with regard to IL-4 production by peripheral T helper cells. Cells from patients with the haplotype II (CCI/CCI) produced significantly less IL-4 than CD4+ cells from patients with the haplotypes I and I/II (Nakashima et al. 2002).

In addition, we observed lower gene and protein IL-4 expressions related to the CCI haplotype, even in heterozygosis with the TCI haplotype (TCI/CCI, S-haplotype). Unlike our study, which investigated 3 polymorphisms in the *IL4* gene to form the haplotype, Bartova et al. (Bartova et al. 2014) investigated 2 polymorphisms (-590 C/T and intron 3 VNTR) in the *IL4* gene in terms of cytokine production, but they did not find significant differences. We hypothesize that these different results were obtained primarily because these authors investigated only two SNPs of the *IL4* haplotype.

Based on previously published data (Anovazzi et al. 2010) from our group indicating an association of these haplotypes with susceptibility to chronic periodontitis, we intended to expand our findings to encompass the potential role that these genetic variations in the *IL4* gene could have in immune response associated triggered by bacteria associated with CP. To this end, we evaluated whether the *IL4* gene haplotypes

influence gene expression and protein production of some key immune mediators, as well as the phenotype of T helper cells and monocytes in response to stimulation with *Aa* and *Pg*.

Initially, we assessed the response of neutrophils, monocytes and CD4⁺ lymphocytes as selected immune cells. All cells types carrying S-haplotype presented increased levels of IL-8 and TNF- α (mRNA and protein) after stimulation with both *Aa* and *Pg*. The present study demonstrated for the first time the relationship between *IL4* gene haplotypes and *IL8* gene expression in leukocytes after stimulation by periodontopathogens. Since IL-8 mediates the neutrophil migration and activation from peripheral blood to the tissue (Baggiolini et al. 1989; Garlet 2010) and TNF- α is a potent pro-inflammatory cytokine that increases the production of collagenases, prostaglandins, chemokines, cell adhesion molecules and bone resorption-related factors (Boyce et al. 2005; Wajant et al. 1998), increased expression of these mediators by bacterial-stimulated leukocytes from S-haplotype patients may correlate with a more pronounced inflammation and greater severity of periodontitis.

In agreement with the enhanced pro-inflammatory response associated with the S-haplotype, Th1/M1 phenotype-associated IL-12 was significantly higher in monocytes of this haplotype; however the results on M1/M2 polarization may be influenced by the fact that we used monocytes and not macrophages in the experiments. IL-12 stimulates the production of IFN- γ and TNF- α by T cells and Natural Killer (NK) cells, which suppress production of IL-4 (Grifka-Walk et al. 2015). In agreement with these findings, we observed that CD4⁺ cells from patients with the S-haplotype had a significantly more pronounced polarization towards the Th1 phenotype (CD4⁺, IFN γ ⁺), which may be driven

by the increased expression of IL-12, associated with reduced levels of IL-4. Tregs are essential in maintaining peripheral tolerance to downregulate the immune response, whereas Th17 cells play a critical role in several autoimmune diseases, inflammation and host defense (Parachuru et al. 2014). Polarization to Th17 was significantly higher in S-haplotype after stimulation with *Aa*; however upon stimulation with *Pg* the proportion of Th17 cells was higher in the P-haplotype. This differential regulation of Th17 polarization may be related with the serotype of the bacteria and their associated virulence factors and antigens. *Aa* (b serotype) is known to induce a more exacerbated Th17 polarization (Diaz-Zuniga et al. 2015) compared to the *Pg* (ATCC 33277) serotype, (Moutsopoulos et al. 2012). Therefore, S-haplotype exhibited a more pronounced Th17 response to a stronger activator and a reduced Th17 response to a weaker inducer of this phenotype. Other possible explanation is that Th17 is a phenotype characterized by plasticity (may be converted into Treg cells) and heterogeneity (there are immunosuppressive FOXP3⁺/RORc⁺/IL17⁺ Th17 cells) (Du et al. 2014), which the limitations in our experimental approach did not allow us to detect.

The experiments performed using whole blood allowed the interaction among the diverse immune cells, which is more representative of the effects of *IL4* haplotypes on the immune response in vivo, albeit less specific in terms of the effect of the *IL4* haplotypes in each immune cell type. Stimulation with *Aa* and *Pg* resulted in a higher production of IL-10 in the P-haplotype. IL-10 is a cytokine with anti-inflammatory properties with a central role in limiting the host tissue damage associated with overt immune response (Saraiva and O'Garra 2010). Thus, an IL-10-attenuated immune response may justify the reduced susceptibility to chronic periodontitis in the P-

haplotype. Differences in the levels of IL-10 are explained mainly by the specificity of flow cytometry to detect the intracellular IL-10 in CD14⁺ cells, whilst in samples from whole blood IL-10 secreted by different immune cells, including dendritic cells and B and T lymphocytes is also detected (Couper et al. 2008).

In general, the S-haplotype was associated with increased production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, including IL-1B, IL-6, IL-7, IL-15, IFN- α , Eotaxin, IP-10, MIG, MCP-1, MIP-1 α , RANTES, and IL-2R. In sharp contrast, the P-haplotype was associated with increased levels of anti-inflammatory mediators, such as IL-10, IL-13 and IL-1-RA. Similarly, Bartova et al. (Bartova et al. 2014) verified that the *IL4* polymorphisms (-590 C/T and intron 3 VNTR) increase the production of IL-6, IFN- γ and IL-1 β after bacterial stimulation.

In summary, we showed that immune cells of patients presenting P-haplotype respond with significantly greater expression of IL-4 in response to stimulation with periodontopathogens. This finding supports previous clinical observation of a higher IL-4 concentration (pg/ μ L) in the gingival crevicular fluid (GCF) of patients carrying this haplotype after 45 days of non-surgical periodontal therapy compared with S-haplotype (Anovazzi et al. 2013). In addition, we provide further insight into the role of these haplotypes on the *IL4* gene for the immune response, by assessing both the response of immune cell types individually and combined. The P-haplotype was associated with an attenuated response to the periodontopathogens, with a suggestive skewing towards the Th2/M2 phenotypes. In sharp contrast, cells from patients with the S-haplotype responded to the same bacterial stimuli with a significantly greater production of pro-inflammatory mediators and more pronounced shift towards the Th1 phenotype. These

results not only indicate that the specific genetic variations studied are functional in immune cells, but also provide biological support to previous clinical findings associating reduced susceptibility to chronic periodontitis with P-haplotype (Anovazzi et al. 2010).

It is important to consider that we used an *in vitro* approach in which only immune cells were assessed, without the participation of important stromal cells involved in the pathogenesis of chronic periodontitis. We arbitrarily selected only two Gram-negative microorganisms associated with periodontal disease due to practical reasons; because of their distinct potencies in activating TLR2/TLR4; and also because of the distinct virulence factors expressed by these bacteria (e.g., leucotoxin, flagella). Thus, the lack of a complex biofilm and also the intensity of the bacterial stimulation are not commensurate with periodontal disease clinically. Another aspect to be weighted in the interpretation of these results is the limited number of patients presenting each genotype, since the specific haplotypes studied in the *IL4* gene may be accompanied by variability in other regions of the same gene and by a myriad of genetic variations in other genes relevant for the immune response. In spite of these limitations, this study provides consistent and relevant information on the functional role of these haplotypes in the *IL4* gene for the response of immune cells to periodontopathogenic bacteria considering the different immune cells both separately and combined.

In conclusion, we demonstrate the functional role of the investigated *IL4* haplotypes and might biologically explain our findings in previous case-control and clinical studies. Moreover, these haplotypes in *IL4* gene have significant effects on the response of immune cells to Gram-negative bacteria, which may be significant

information also for other conditions involving host-microbial interactions, such as colitis and sepsis.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by State of São Paulo Foundation Research (FAPESP) grants #2013/17887-8 and #2014/04638-2.

Table 1. Demographic profile and periodontal variables of the patients enrolled in the study.

Haplotypes/ Characteristics	TCI/CCI n= 5	TTD/CTI n= 5
Mean Age (\pm SD)	42.6 (\pm 10.4)	42.8 (\pm 11,0)
Gender n (%)		
Female	4 (90.0)	4 (90.0)
Male	1 (10.0)	1 (10.0)
N° of teeth (\pm SD)	23.38 (\pm 3.54)	22.80 (\pm 4.21)
BoP (%; mean \pm SD)	0.82 (\pm 0.28)	0.87 (\pm 0.27)
PPD (mm; mean \pm SD)	1.23 (\pm 0.11)	1.28 (\pm 0.19)
CAL (mm; mean \pm SD)	1.4(\pm 0.12)	1.6 (\pm 0.11)

n = individuals number; % = percentage of the number of individuals.

SD= Standard Deviation

BOP = Bleeding on Probing

PPD = Periodontal Probing Depth

CAL= Clinical Attachment Level

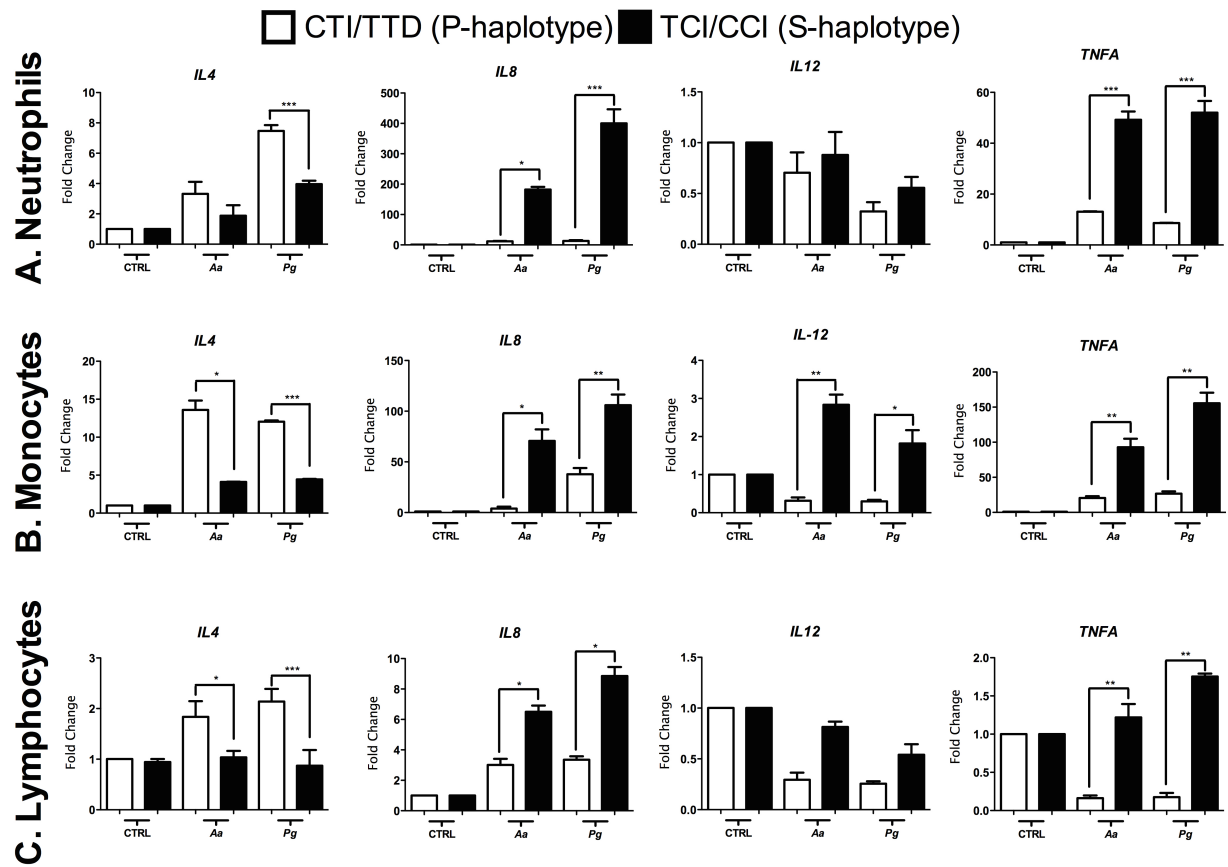


Figure 1. Gene expression (mRNA) levels of IL4, IL 8, IL 12 and TNF-a of the isolated cells from the peripheral blood of patients carrying susceptibility or protection haplotypes after Aa and Pg stimulation. **A.** Neutrophils, **B.** monocytes, **C.** lymphocytes. The results are represented as fold change (normalization to the endogenous control). * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

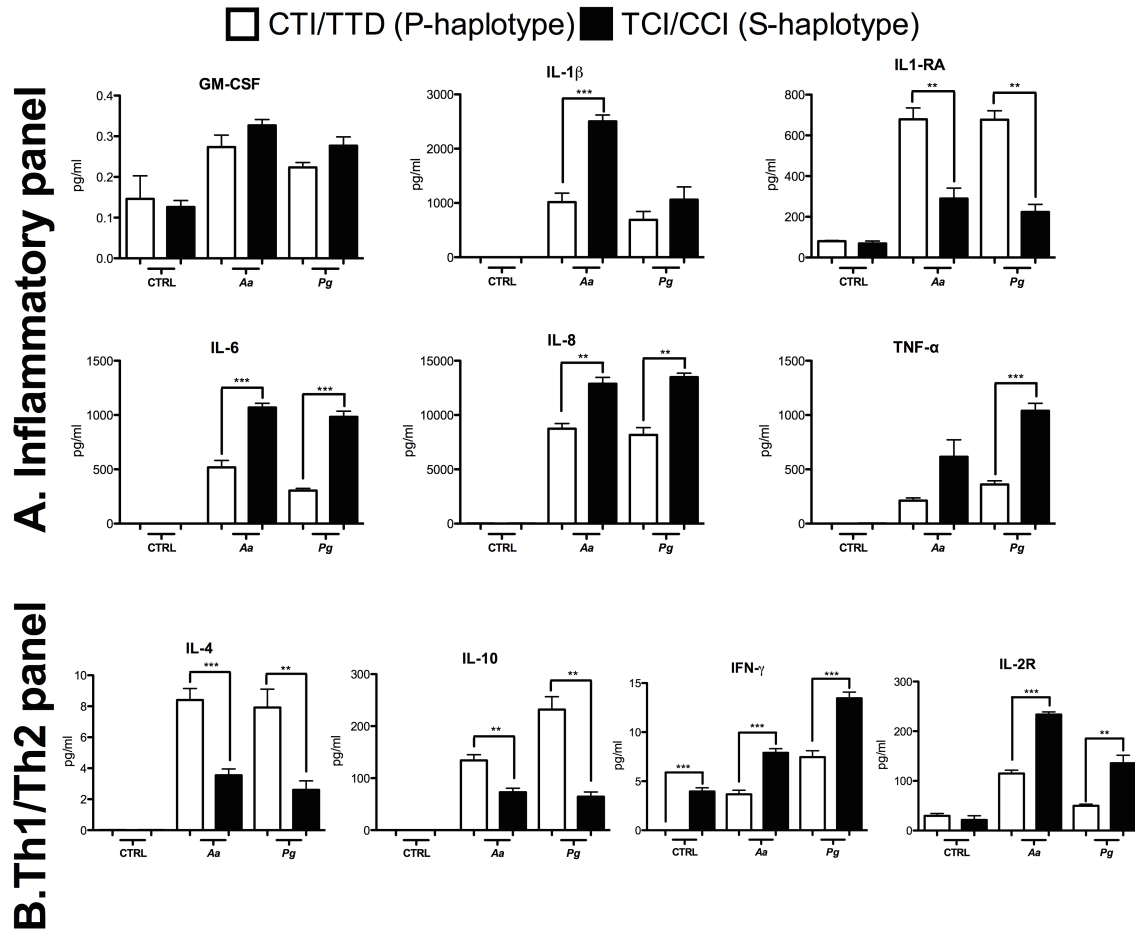


Figure 2. A. Inflammatory Panel, B. Th1/Th2 Panel represented by the proteins analysed by the multiplex assay in the whole blood of patients carrying susceptibility or protection haplotypes after Aa and Pg stimulation. The concentration is expressed in pg/mL. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

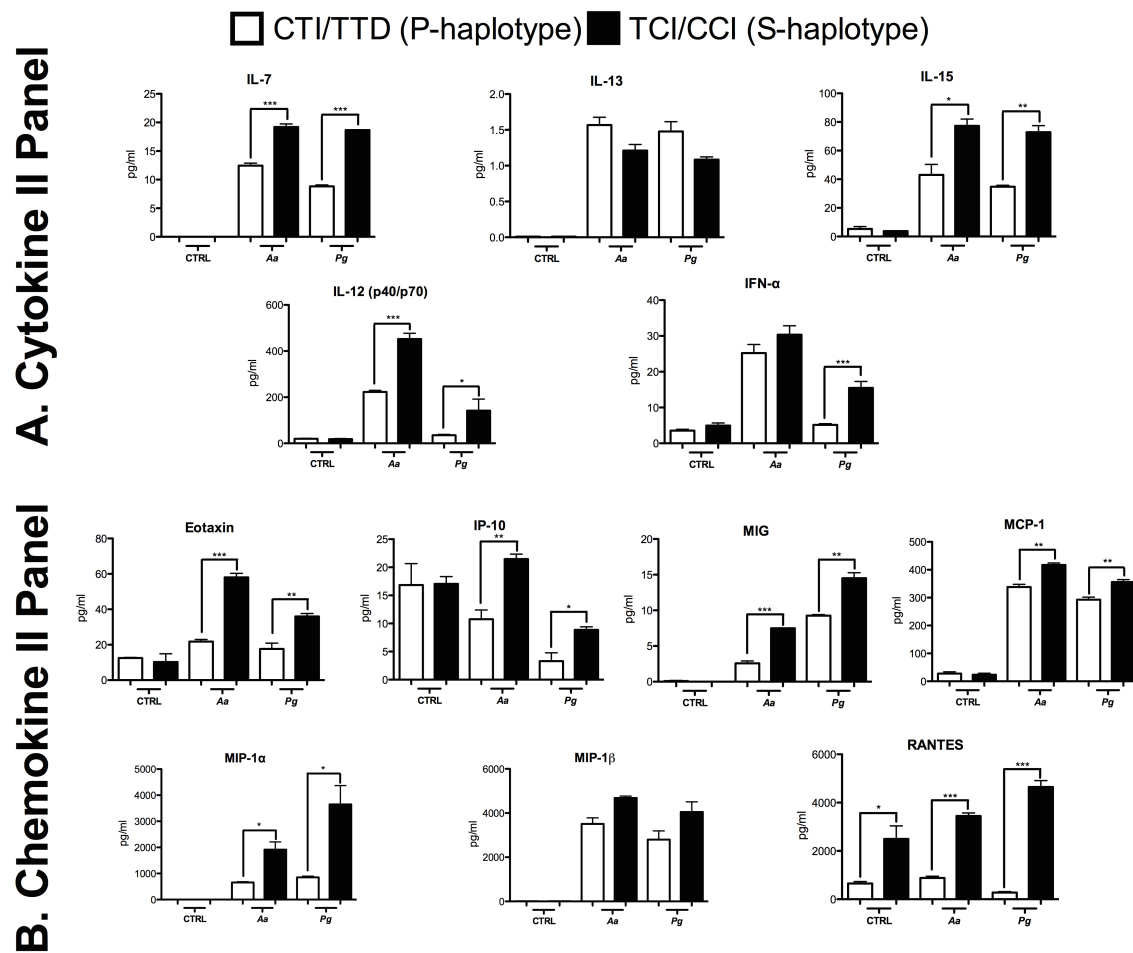


Figure 3. **A.** Cytokine II Panel, **B.** Chemokine II Panel represented by the proteins analysed by the multiplex assay in the whole blood of patients carrying susceptibility or protection haplotypes after Aa and Pg stimulation. The concentration is expressed in pg/mL. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

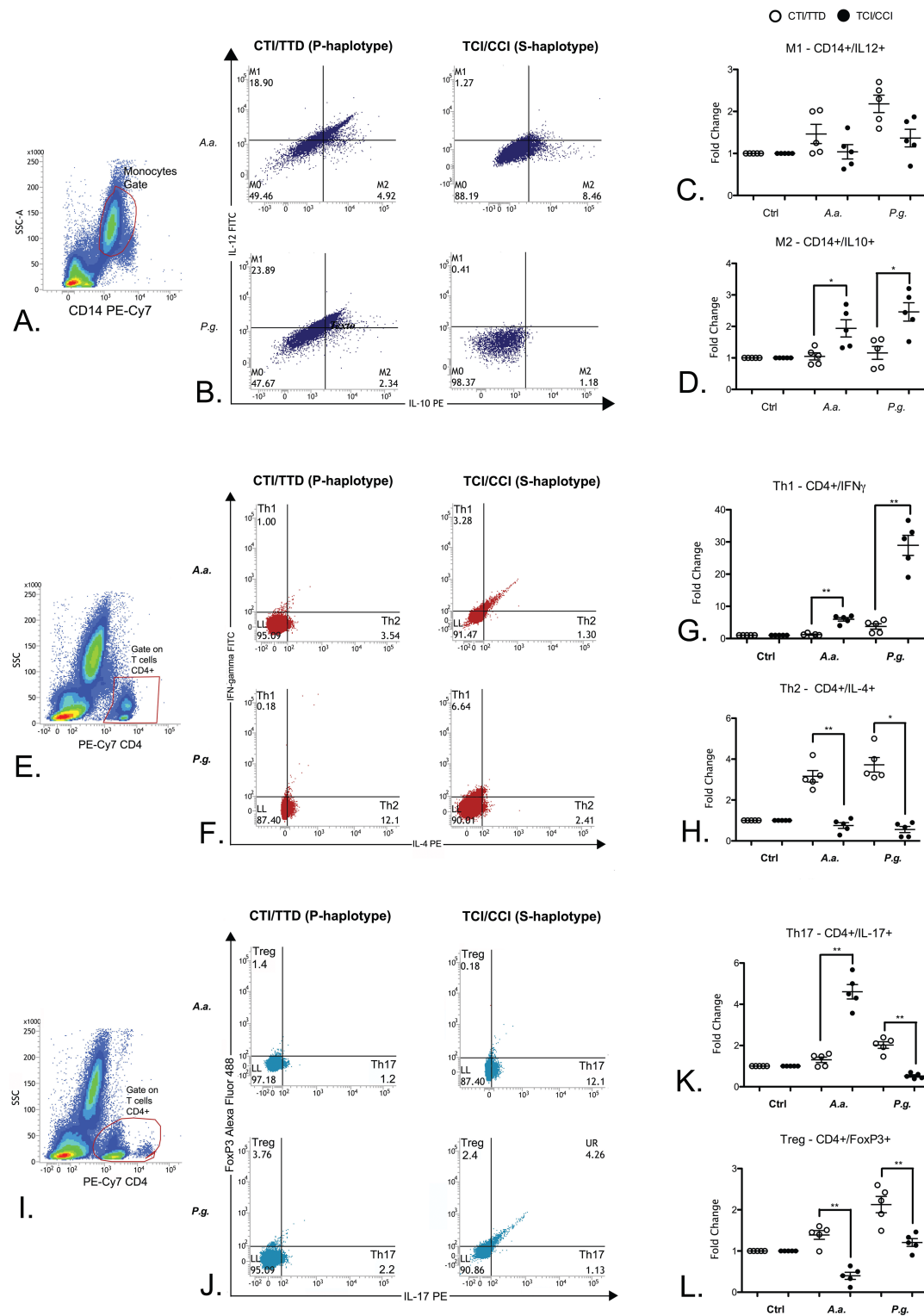


Figure 4. Profiles assessed by flow cytometry in the whole blood of patients with susceptibility or protection haplotypes after Aa and Pg stimulation. **A.** Monocytes gate; **B.** dot-plot representative of M1 and M2; **C.** Fold change of all patients from the M1

profile; **D.** Fold change of all patients from the M2 profile. **E.** CD4+ gate; **F.** dot-blot representative of Th1 and Th2; **G.** Fold change of all patients from the Th1 profile; **H.** Fold change of all patients from the Th2 profile. **I.** CD4+ gate; **J.** dot-blot representative of Th17 and Treg; **K.** Fold change of all patients from the Th17 profile; **L.** Fold change of all patients from the Treg profile. * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$.

REFERENCES

- Anovazzi G, Finoti LS, Corbi SC, Kim YJ, Marcaccini AM, Gerlach RF, Capela MV, Orrico SR, Cirelli JA, Scarel-Caminaga RM. 2013. Interleukin 4 haplotypes of susceptibility to chronic periodontitis are associated with il-4 protein levels but not with clinical outcomes of periodontal therapy. *Human immunology*. 74(12):1688-1695.
- Anovazzi G, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, Scarel-Caminaga RM. 2010. Polymorphisms and haplotypes in the interleukin-4 gene are associated with chronic periodontitis in a brazilian population. *J Periodontol*. 81(3):392-402.
- Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. 1989. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *The Journal of clinical investigation*. 84(4):1045-1049.
- Bartova J, Linhartova PB, Podzimek S, Janatova T, Svobodova K, Fassmann A, Duskova J, Belacek J, Holla LI. 2014. The effect of il-4 gene polymorphisms on cytokine production in patients with chronic periodontitis and in healthy controls. *Mediators of inflammation*. 2014:185757.
- Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Xing L. 2005. Tnf-alpha and pathologic bone resorption. *The Keio journal of medicine*. 54(3):127-131.
- Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. 2009. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of porphyromonas gingivalis and treponema denticola in subgingival plaque. *Oral microbiology and immunology*. 24(6):469-477.
- Couper KN, Blount DG, Riley EM. 2008. Il-10: The master regulator of immunity to infection. *Journal of immunology*. 180(9):5771-5777.

- Diaz-Zuniga J, Melgar-Rodriguez S, Alvarez C, Monasterio G, Benitez A, Ciuchi P, Diaz C, Mardones J, Escobar A, Sanz M et al. 2015. T-lymphocyte phenotype and function triggered by aggregatibacter actinomycetemcomitans is serotype-dependent. *Journal of periodontal research*. 50(6):824-835.
- Du R, Zhao H, Yan F, Li H. 2014. Il-17+foxp3+ t cells: An intermediate differentiation stage between th17 cells and regulatory t cells. *Journal of leukocyte biology*. 96(1):39-48.
- Finoti LS, Anovazzi G, Pigossi SC, Corbi SC, Teixeira SR, Braido GV, Kim YJ, Orrico SR, Cirelli JA, Mayer MP et al. 2013. Periodontopathogens levels and clinical response to periodontal therapy in individuals with the interleukin-4 haplotype associated with susceptibility to chronic periodontitis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 32(12):1501-1509.
- Garlet GP. 2010. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res*. 89(12):1349-1363.
- Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Garlet TP, Cestari TM, Lima HR, Ramos ES, de Souza Malaspina TS, Santos CF, Garlet GP et al. 2009. The role of toll-like receptor 2 in the recognition of aggregatibacter actinomycetemcomitans. *Journal of periodontology*. 80(12):2010-2019.
- Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. 2002. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 13(1):17-34.
- Grifka-Walk HM, Giles DA, Segal BM. 2015. Il-12-polarized th1 cells produce gm-csf and induce eae independent of il-23. *European journal of immunology*. 45(10):2780-2786.
- Heitz-Mayfield LJ. 2005. Disease progression: Identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol*. 32 Suppl 6:196-209.
- Laine ML, Farre MA, Gonzalez G, van Dijk LJ, Ham AJ, Winkel EG, Crusius JB, Vandenbroucke JP, van Winkelhoff AJ, Pena AS. 2001. Polymorphisms of the

- interleukin-1 gene family, oral microbial pathogens, and smoking in adult periodontitis. *Journal of dental research*. 80(8):1695-1699.
- Lima HR, Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Torres SA, Santos CF, Garlet GP, da Silva JS, Campanelli AP. 2010. The essential role of toll like receptor-4 in the control of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Journal of clinical periodontology*. 37(3):248-254.
- Loos BG, John RP, Laine ML. 2005. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol*. 32 Suppl 6:159-179.
- Mahanonda R, Pichyangkul S. 2007. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*. 43:41-55.
- Michalowicz BS. 1994. Genetic risk factors for the periodontal diseases. *Compendium*. 15(8):1036, 1038, 1040 passim.
- Moutsopoulos NM, Kling HM, Angelov N, Jin W, Palmer RJ, Nares S, Osorio M, Wahl SM. 2012. *Porphyromonas gingivalis* promotes th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *Journal of autoimmunity*. 39(4):294-303.
- Nakamura H, Fukusaki Y, Yoshimura A, Shiraishi C, Kishimoto M, Kaneko T, Hara Y. 2008. Lack of toll-like receptor 4 decreases lipopolysaccharide-induced bone resorption in c3h/HeJ mice in vivo. *Oral microbiology and immunology*. 23(3):190-195.
- Nakashima H, Miyake K, Inoue Y, Shimizu S, Akahoshi M, Tanaka Y, Otsuka T, Harada M. 2002. Association between il-4 genotype and il-4 production in the Japanese population. *Genes Immun*. 3(2):107-109.
- Parachuru VP, Coates DE, Milne TJ, Hussaini HM, Rich AM, Seymour GJ. 2014. Forkhead box p3-positive regulatory T-cells and interleukin 17-positive T-helper 17 cells in chronic inflammatory periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 49(6):817-826.
- Saraiva M, O'Garra A. 2010. The regulation of il-10 production by immune cells. *Nature reviews Immunology*. 10(3):170-181.

- Shapira L, Wilensky A, Kinane DF. 2005. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol.* 32 Suppl 6:72-86.
- Stern DL. 2000. Evolutionary biology. The problem of variation. *Nature.* 408(6812):529, 531.
- Vandenbroeck K, Goris A. 2003. Cytokine gene polymorphisms in multifactorial diseases: Gateways to novel targets for immunotherapy? *Trends Pharmacol Sci.* 24(6):284-289.
- Wajant H, Pfeffer K, Pfizenmaier K, Scheurich P. 1998. Tumor necrosis factors in 1998. *Cytokine & growth factor reviews.* 9(3-4):297-302.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi investigado neste estudo a possível influência que os haplótipos TCI/CCI e CTI/TTD no gene *IL4* podem ter na expressão do próprio gene *IL4* e de outros genes do sistema imune, na produção de citocinas secretadas e intracelulares. Os experimentos in vitro foram realizados em células da resposta imune provenientes de pacientes que carregavam os haplótipos de interesse submetidas a estímulos inflamatórios e periodontopatogênicos. Foi verificado para os diferentes estímulos que o haplótipo TCI/CCI (Hap-2), previamente associado à suscetibilidade à DP, perante tais estímulos expressaram e produziram níveis significativamente maiores para citocinas e genes relacionados ao perfil Th1 (pró-inflamatório), enquanto o haplótipo CTI/TTD (Hap-1), previamente associado à proteção contra a DP, mostrou expressão gênica e níveis de citocinas significativamente maiores associados ao perfil anti-inflamatório Th2.

Considerando estudos que investigam a funcionalidade de polimorfismos, é mais comum e menos complexo investigar um único polimorfismo do que uma combinação deles, como um haplótipo. A funcionalidade do polimorfismo -590(T/C) no gene *IL4* foi investigada em pacientes com asma²⁴ e com esclerose múltipla², e demonstraram que o alelo T (-590T) levou à uma maior expressão da proteína IL-4 comparado ao promotor clonado contendo o alelo C^{2, 24}. No presente estudo o menor efeito na atividade transcricional do gene repórter GFP foi demonstrada pelo polimorfismo -590(T/C) no gene *IL4*. Como afirmado por Terry et al.²⁹, o estudo funcional de um único polimorfismo não irá revelar o efeito funcional global do polimorfismo em combinação com outros polimorfismos. Para aprofundar a investigação da funcionalidade

dos haplótipos no gene *IL4*, utilizamos plasmídeos construídos artificialmente (constructos) contendo cada haplótipo (agora arranjados como alelos, ex: TCI). É importante verificar em cada haplótipo isoladamente qual é o potencial de atividade transcricional promovida por ele. Foi demonstrado que todos os haplótipos, principalmente o CTI, promoveram maior atividade transcricional do gene repórter GFP do que o polimorfismo -590(T/C) isoladamente. Além disso, lembrando que a resposta de um gene é geralmente mediada pelos dois cromossomos homólogos, as consequências naturais de expressão de um gene são influenciadas por uma combinação de dois haplótipos, já que cada um está situado em um dos cromossomos homólogos. Assim, também é importante investigar a funcionalidade de haplótipos dispostos como genótipos (ex: CTI/TTD) para avaliar do modo mais real possível o impacto da combinação destes haplótipos nos níveis de transcrição e tradução de proteínas. Portanto, foi investigada a funcionalidade dos haplótipos CTI/TTD (Hap-1) ou TCI/CCI (Hap-2) utilizando células sanguíneas de pacientes contendo tal carga genética frente à estímulo inflamatório. Como mencionado, o haplótipo TCI/CCI (Hap-2) produziu resposta inflamatória mais relacionada ao perfil Th1 (pró-inflamatório), enquanto o haplótipo CTI/TTD (Hap-1), foi mais relacionado ao perfil anti-inflamatório Th2. Acredita-se que isso pode ter relevância no processo patológico de diferentes doenças, podendo explicar como a carga genética do paciente pode levar à maior ou menor suscetibilidade a doenças.

Cabe destacar que o presente estudo investigou o efeito que um polimorfismo intrônico poderia ter na atividade transcricional de um gene, o que ainda é bastante incomum. Apesar da crescente evidência sobre a funcionalidade biológica que polimorfismos intrônicos podem ter (por exemplo, na produção de RNAs não

codificantes¹⁹, na presença de elementos de ação regulatória cis ou trans que regulam a expressão do gene)²³, poucos estudos exploraram a potencial funcionalidade de polimorfismos intrônicos^{12, 19, 23}. Pelo que foi possível verificar na literatura científica, este é o primeiro estudo que utilizou plasmídeos construídos de modo a possibilitar a investigação do efeito que o polimorfismo intrônico VNTR no gene *IL4* poderia ter na atividade transcricional.

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.

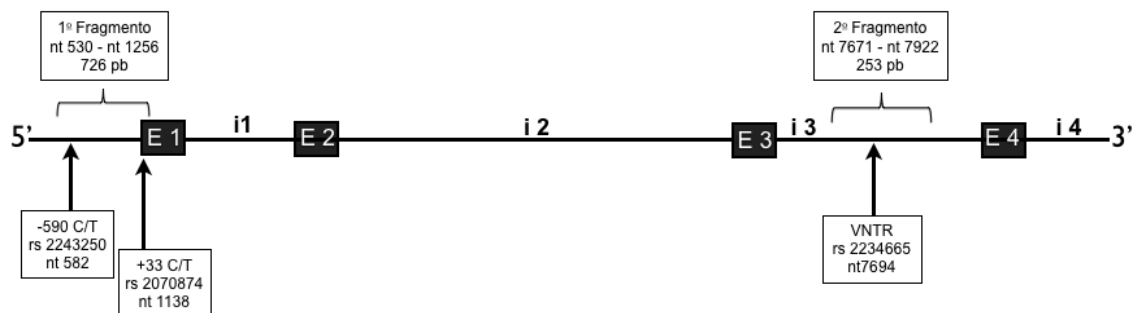
APÊNDICE A

METODOLOGIA DETALHADA COMPARTILHADA

Procedimentos para confirmação dos haplótipos dos polimorfismos do gene *IL4*

Sequenciamentos foram realizados para confirmar os alelos verificados nos estudos anteriores por *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A verificação por sequenciamento dos haplótipos de suscetibilidade (TCI/CCI) ou proteção (TTD/CTI) foi realizada para selecionarmos os pacientes. Novas reações de PCR foram realizadas para amplificar regiões de interesse do gene que contivessem os polimorfismos -590 (C/T), +33 (C/T) e 70pb (Del/Ins) do gene *IL4*, e estão descritas abaixo as condições específicas para cada reação:

Figura A1 - Esquema do gene *IL4*, com destaque para a amplificação de regiões que contém os polimorfismos -590 (C/T), +33 (C/T) e VNTR.



Fonte: Elaboração Própria

1o Fragmento do gene *IL4*: Compreende o Polimorfismo na base -590 (C/T), rs2243250, localizado no nucleotídeo 582, e o Polimorfismo na base +33 (C/T), rs2070874,

localizado no nucleotídeo 1138. Essa região foi amplificada por PCR, utilizando os seguintes *primers*:

“Forward” - 5’ TCA CCT GAT ACG ACC TGT CC 3’

“Reverse” - 5’ ATA TCG CAC TTG TGT CCG TG 3’

Condições da PCR: 1 ciclo a 95°C (5 min), a seguir 34 ciclos a 95°C, 55°C e 72°C por 1 min. cada temperatura. Extensão final a 72°C por 5 min. O produto amplificado da PCR foi de 726pb.

2o Fragmento do gene *IL4*: Compreendido pelo Polimorfismo *VNTR* 70pb Deleção/ Inserção: foi amplificada por PCR a região do intron 3 do gene *IL4* que contém, utilizando os seguintes *primers*:

“Forward” - 5’ TAG GCT GAA AGG AAA GC 3’

“Reverse” - 5’ CTG TTC ACC TCA ACT GCT CC 3’

Condições da PCR: 1 ciclo a 93°C (3 min), a seguir 39 ciclos a 92°C, 58°C e 72°C por 1 min. cada temperatura. Extensão final a 72°C por 10 min. O produto amplificado por PCR foi de 253 pb se a amostra de DNA fosse de um indivíduo homocigoto para a inserção de 70 pb no intron 3. Se a amostra de DNA fosse de um indivíduo homocigoto para a deleção de 70 pb era observado um produto amplificado de 183 pb. Caso a amostra de DNA fosse de um indivíduo heterocigoto para esse polimorfismo do tipo *VNTR*, era possível observar dois produtos amplificados para o mesmo indivíduo, um de 253 pb e outro de 183 pb.

A análise dos polimorfismos citados (10 e 20 fragmento) foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) e corados com brometo de etídio. Os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta. Os géis

foram fotografados com o fotodocumentador GDS 8000 System (UVP, Upland, CA, USA).

Purificação dos produtos da PCR de *IL4* e Sequenciamento das amostras

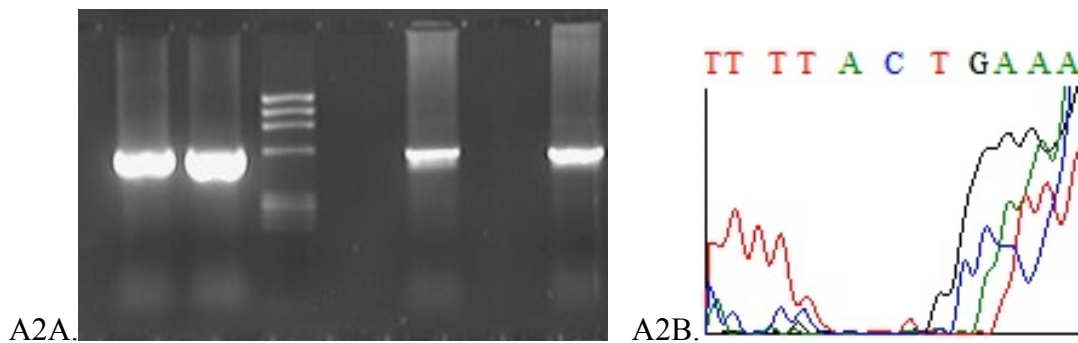
Os produtos da reação de PCR foram verificados em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e excisados do gel para purificação com o kit PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen™), seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras do estudo piloto foram submetidas à quantificação de DNA (A260) e análise da pureza (A260/280) com auxílio do espectrofotômetro NanoView®. Os produtos das reações foram purificados para sequenciamento. Para a reação de sequenciamento, empregando-se os iniciadores do vetor, foram utilizados como molde 5µL de cada produto de PCR. Os fragmentos de DNA obtidos foram enviados ao Serviço de Sequenciamento de DNA, do Centro de Estudos do Genoma Humano, da Universidade de São Paulo (USP), onde foi realizado sequenciamento do produto.

Confirmação dos haplótipos de cada paciente

O DNA foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, através de um bochecho com solução de glicose a 3% por 2 min. A extração do DNA foi realizada. Após a reação de PCR para amplificação dos fragmentos (Figura A2A), os produtos das reações foram purificados e submetidos à quantificação de DNA (A260) apresentando um valor mínimo de 20 ng/uL necessário para o sequenciamento. A sequencia dos fragmentos de DNA sequenciados (Figura A2B), foram então colocadas no NCBI Blast, o qual reconheceu o fragmento como pertencente ao gene *IL4* de *Homo sapiens* (Figura

A2C). As sequências do gene *IL4* e do fragmento sequenciado foram então alinhadas no programa BioEdit, mostrando a equivalência entre ambas (Figura A2D). No primeiro fragmento, o nucleotídeo 582 representa o polimorfismo -590 (T/C), e mostrou uma alteração de bases quando comparado o gene com o fragmento sequenciado (Figura A2D). O segundo fragmento que contém o polimorfismo VNTR, 70pb Deleção/ Inserção, ou seja os indivíduos homocigotos para a inserção de 70 pb tem o produto amplificado de 253 pb (I/I); os indivíduos homocigotos para a deleção de 70 pb tem o produto amplificado de 183 pb (D/D); nos indivíduos heterocigotos para esse polimorfismo do tipo *VNTR*, foi possível observar dois produtos amplificados, um de 253 pb e outro de 183 pb (I/D), (Figura A3). Para confirmação dos referidos alelos VNTR (inserção ou deleção de 70 pb) foi realizada a genotipagem seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, corados com nitrato de prata Figura 3). A verificação por sequenciamento dos haplótipos de suscetibilidade (TCI/CCI) ou proteção (TTD/CTI) foi realizada para 20 pacientes de cada grupo previamente genotipados para selecionarmos 5 desses pacientes por grupo.

Figura A2 - Resultados obtidos do Fragmento. A- Gel de agarose a 2%, apresentando resultados da genotipagem por PCR com tamanho de 726pb. M=marcador de peso molecular *PhiX* 174 *Hae III* (Fermentas); B- Resultado do sequenciamento; C- Reconhecimento da sequencia dos fragmentos de DNA pelo NCBI Blast, *Homo sapiens IL4*; D- Alinhamento das sequencias do gene *IL4* e do fragmento sequenciado no programa BioEdit, mostrando a equivalência entre ambas.

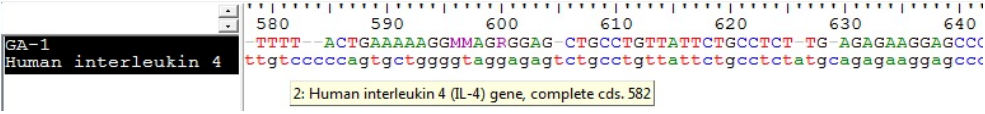


Descriptions NCBI Blast:Nucleotide Sequence (150 letters)

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NG_023252.1	Homo sapiens interleukin 4 (IL4), RefSeqGene on chromosome 5	127	127	67%	9e-27	87%	

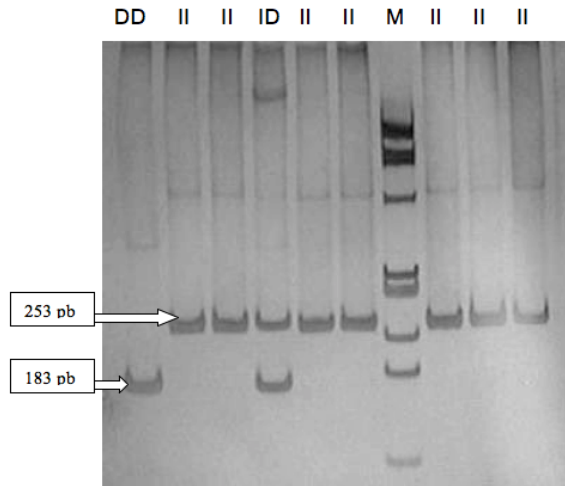
A2C.

A2D. 

2: Human interleukin 4 (IL-4) gene, complete cds. 582

Fonte: Elaboração própria

Figura A3 - Gel de poliacrilamida a 10% apresentando resultados da genotipagem por *PCR* para o locus VNTR 70 pb (I/D). M= marcador de peso molecular *PhiX 174 Hae III* (Fermentas).



Fonte: Elaboração própria

Com os resultados obtidos da genotipagem (VNTR no intron) e do sequenciamento (região promotora), verificamos que a metodologia empregada foi eficiente para comprovar que cada paciente selecionado apresenta o referido haplótipo para o gene *IL4*.

Descrição da Amostra para o gene *IL4*

Após aprovação deste projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOAr – UNESP (CAAE 18527813.7.0000.5416), foram contatados 10 indivíduos acima de 23 anos, não importando o gênero ao qual pertencem nem a etnia, que possuísem:

- Haplótipo que confere suscetibilidade à DP (S): TCI/CCI (n=5)

-Haplótipo que confere proteção ao desenvolvimento da DP (P): TTD/CTI (n=5)
(Controle)

Cabe acrescentar que esse número de 5 indivíduos para cada haplótipo foi obtido de cálculo amostral (DDS Research: Sample Size Calculation), considerando-se uma variação de 0,6 unidades e desvio-padrão de 0,3 unidades, ao nível de significância de 0,5% e poder de 95%. A realização dos experimentos descritos a seguir foram realizados com o sangue doado pelos pacientes que possuem os haplótipos de interesse no gene *IL4*.

Após amplo esclarecimento dos indivíduos que apresentavam a carga genética citada acima, aqueles que aceitaram participar da pesquisa consentiram na coleta de sangue para realização de técnicas *in vitro* para avaliação da expressão gênica dos haplótipos no gene *IL4* na resposta imune.

De cada voluntário foi coletado sangue periférico para separação de neutrófilos, monócitos e linfócitos T. Foram realizados experimentos em que tais células dos pacientes receberam estímulos com PMA/Ionomomicina e com o IL-1 β no Capítulo 1 e estímulos com bactérias Gram-negativas associadas à doença periodontal: *P.gingivalis*, cepa ATCC 33277; *A.actinomycescomitans*, cepa JP2 no Capítulo 2.

Considerando a interação microbiota/hospedeiro, foi avaliado se esses haplótipos influenciam a regulação da expressão gênica de *IL4* em nível de RNAm (por RT-qPCR); proteico por multiplex (proteínas secretadas); e Citometria de fluxo (proteínas intracelulares, para caracterização do perfil fenotípico celular). Como controles foram realizados os mesmos experimentos utilizando as células obtidas dos pacientes com os haplótipos de proteção (*IL4*). Os estímulos, conforme descrição na Tabela A1, foram realizados para as diferentes células e permitindo as avaliações abaixo.

Tabela A1 - Experimentos e estímulos (período/concentrações) realizados

Experimento	Nº Células (por poço)	Período Estímulo	Estímulos (concentração)
RT-qPCR (RNAm)	5×10^5	4 h	<ul style="list-style-type: none"> - Controle negativo - PMA/ Ionomicina (50 / 500 ng/ml) - IL-1 beta (5 ng/ml) - Co-cultura <i>P.gingivalis</i> - Co-cultura <i>A.actinomycescomitans</i>
Citometria de Fluxo (proteínas intracelulares)	1×10^6	72 h	
Imunoensaio Multiplex (proteínas secretadas)	1×10^6	12 h	

Fonte: Elaboração Própria

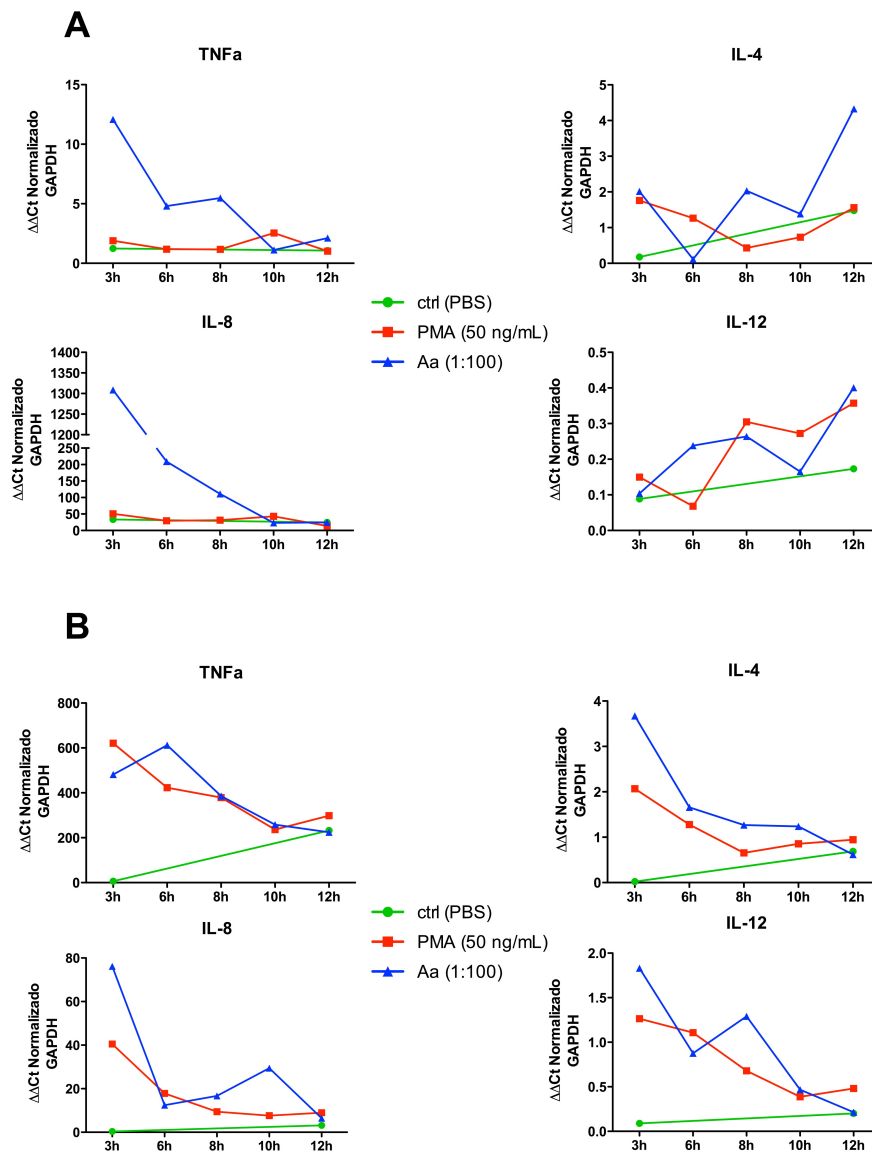
Experimento piloto para determinação do tempo de estímulo para os experimentos de expressão gênica

Foram selecionados 2 pacientes de ambos os sexos (1 mulher e 1 homem) que concordaram em participar como doadores voluntários do sangue periférico nesse experimento inicial para determinar o melhor período de estimulação. Foi coletado sangue periférico de cada doador em tubos vacutainers contendo EDTA. Os PBMCs e neutrófilos foram isolados seguindo o protocolo do reagente Histopaque (1119 e 1077, Sigma-Aldrich). Em seguida foi realizada a separação das populações de Linfócitos T dos PBMC por separação magnética utilizando Beads seguindo as instruções do fabricante do kit. Ao final os Neutrófilos e Linfócitos T foram contados e plaqueados em meio RPMI (RPMI Medium 1640, Gibco) suplementado com antibióticos e soro fetal bovino (FBS) a 1% na densidade de 5×10^5 células por poço em placas de 48 poços. Previamente aos

estímulos, 7 horas antes, os Linfócitos T foram ativados com a adição de beads que ativam os receptores CD3/CD28. Os estímulos nesse experimento inicial foram: PBS (controle), PMA (50 ng/mL) e Aa (1:100). Os períodos testados foram: 3h, 6h, 8h, 10h e 12h.

Após as coletas o RNA foi extraído, sintetizado o cDNA, e RT-qPCR realizado para os seguintes genes: *IL4*, *IL8*, *IL12*, e *TNFA* e *GAPDH* como gene constitutivo (Figura A4). A partir dos resultados obtidos do experimento piloto, optamos por padronizar o período de estimulação em 4 horas nos experimentos de RT-qPCR, visto que na maioria dos genes avaliados neste período encontramos maiores níveis de expressão gênica.

Figura A4 - RT-qPCR dos Neutrófilos (A) e Linfócitos T (B) nos diversos períodos avaliados. Nesses experimentos podemos observar uma predominância de maior expressão dos genes avaliados no período inicial de 3h, com uma diminuição gradativa dos níveis ao longo dos períodos, principalmente em relação aos Linfócitos T. Os neutrófilos apesar de em alguns genes, *IL4* e *IL12*, mostrarem um aumento dos níveis ao longo do tempo, houve um padrão de crescimento similar ao período inicial, com o *A.a.* induzindo maior expressão. Resultado corresponde a dois experimentos independentes feitos em duplicata.



Fonte: Elaboração Própria

Coleta e separação das células do sangue periférico

O sangue periférico doado pelos voluntários, após coletado foi imediatamente separado em gradiente de densidade utilizando Histopaque (Sigma-Aldrich Co.). Inicialmente foi preparado um gradiente de densidade pipetando 3,0 mL de Histopaque 1119 em um tubo tipo Falcon de 15 mL à temperatura ambiente, sobre este foi pipetado gentilmente 3,0 mL de Histopaque 1077, a seguir 6,0 mL de sangue periférico. Os tubos foram submetidos à centrifugação (700 g por 30 min, à temperatura ambiente, com ajuste de aceleração mínima ($a=2$) e sem *brake* ($b=0$)). Após a centrifugação foram formadas três camadas: a superior contendo células mononucleares, a intermediária os neutrófilos, e a camada inferior os eritrócitos. Experimentos-piloto confirmaram a efetividade deste protocolo para separação das células, bem como a manutenção de viabilidade superior à 95%.

Após a separação inicial de PMNs/neutrófilos de células mononucleares em gradiente de densidade, os neutrófilos foram plaqueados de acordo com a Tabela A1 (que descreve os estímulos). A partir dos PBMCs foram separados linfócitos T e monócitos com kits de isolamento magnético. Esta etapa de separação celular foi realizada utilizando kits comercialmente disponíveis de beads magnéticos conjugados à coquetel de anticorpos para antígenos de superfície que possibilitam a separação negativa de linfócitos T e monócitos por meio da depleção dos outros tipos celulares (Dynabeads Untouched Human Monocytes e Dynabeads Untouched Human T cells, Invitrogen Corp.), de forma que os tipos celulares de interesse estivessem 'intocados' (i.e., sem anticorpos/beads na sua superfície). A população de células mononucleares separadas por centrifugação em Histopaque foram lavadas, ressuspensas e contadas utilizando azul de

trypan para identificação de células mortas. Duas alíquotas foram preparadas e para separação de linfócitos T e monócitos foi utilizado um kit específico de separação magnética (InvitrogenCorp.). Inicialmente o volume necessário de anticorpos/beads foi lavado em tampão de isolamento (PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} suplementado 0.1% BSA e 2mM EDTA). As células foram ressuspensas em tampão de isolamento e à esta suspensão foram acrescentadas as soluções de bloqueio e o coquetel de anticorpos, seguido de incubação por 20 min à 4°C. Após lavagem das células para remoção dos anticorpos não ligados, foram acrescentados os beads magnéticos seguindo-se nova incubação com agitação constante e suave por 15 min à 4°C para separação de monócitos. Para separação de linfócitos T a incubação foi semelhante com agitação constante e suave por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida foi feita nova lavagem para remoção dos beads não conjugados. As células foram ressuspensas em tampão de isolamento, colocadas em estante magnética por 2 minutos. As células em suspensão não aderidas à parede do tubo foram cuidadosamente transferidas para um novo tubo falcon, contadas e plaqueadas para os experimentos subsequentes.

Avaliação da expressão gênica (RT-qPCR)

Os estímulos utilizados foram aqueles apresentados na Tabela A1, de modo que foi investigada a expressão dos genes-alvo indicados na Tabela A2 a seguir. Em todos os experimentos os controles negativos foram representados por células não estimuladas (considerando que o veículo de todos os estímulos foi PBS, inócuo para as células) e todos os experimentos foram repetidos duas vezes de forma independente.

Tabela A2 - Genes-alvo e assay IDs dos conjuntos de primers/sonda TaqMan utilizados nas reações de RT-qPCR

Gene	Cód. Ensaio	Acession #	Cobertura (exons)	Amplicon (bp)
<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1	NM_002046.4	7-8	93
<i>IL4</i>	Hs00174122_m1	NM_000589.2	3-4	70
<i>IL8</i>	Hs00174103_m1	NM_000584.3	1-2	101
<i>TNFA</i>	Hs01113624_g1	NM_000594.2	2-3	143
<i>IL12</i>	Hs01073447_m1	NM_000882.3	1-2	52

Fonte: Elaboração Própria

O RNA total foi isolado utilizando um sistema de colunas de afinidade para o isolamento e purificação do RNA total, incluindo tratamento com DNase (RNAqueous kit, Ambion Inc.). A seguir foi verificada a pureza e quantidade do RNA total extraído por meio de espectrofotômetro UV para microvolumes (Nanovue Plus, GE Healthsciences). Todas as amostras mostraram razão entre 1.8 e 2.2, comprovando a qualidade necessária para os próximos experimentos. Em seguida foi realizada a síntese de cDNA utilizando 300 ng de RNA total por meio de primers *random hexamers* e moloney leukemia vírus reverse transcriptase, segundo as instruções do fornecedor do kit (High CapacityRT kit, Applied Biosystems).

PCR em Tempo Real ou quantitativo (RT-qPCR)

A reação de PCR em tempo real foi realizada com conjuntos de primers e sondas pré-desenhadas (Gene expression assays, Applied Biosystems) para detecção dos genes-

alvo (*IL4*, *IL8*, *TNFA*, *IL12*) e do gene constitutivo (*GAPDH*) por meio do sistema TaqMan (TaqMan Universal PCR Master Mix, AppliedBiosystems). A reação foi realizada a partir de: 10 μ L de *TaqMan Fast Advanced Master Mix* 2x, 1,0 μ L de primers, 7,0 μ L de água e 2,0 μ L de cDNA, sendo que no controle negativo, foi adicionado 2,0 μ L de água ao invés do cDNA. Foi utilizado o equipamento StepOne Plus (AppliedBiosystems) com as condições de ciclagem otimizadas pelo fabricante (1 min a 95°C para desnaturação inicial seguido de 40 ciclos de 20 minutos a 60° C). Os valores de *Cycle threshold* (Ct) obtidos de cada reação foram calculados pelo software do equipamento, sendo que a expressão de cada gene alvo foi normalizada pela expressão do gene constitutivo (Δ Ct). Em seguida foi empregado o método de $\Delta\Delta$ Ct para análise da expressão gênica. Os resultados foram demonstrados como *fold change* em relação aos controles negativos (células não estimuladas) para cada estímulo.

Avaliação da expressão protéica (Multiplex)

Para avaliação abrangente da influência dos diferentes haplótipos na produção de mediadores inflamatórios, ensaios multi-analitos conjugados a *beads* de poliestireno contendo fluoróforos (sistema Multiplex) foram utilizados, segundo as informações do fornecedor do kit. O kit utilizado permite a detecção de 25 citocinas e quimiocinas relacionadas à resposta imune, incluindo GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, MIP-1 β (Macrophage inflammatory protein-1 β), Eotaxin, RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted), MIG (Monokine Induced By Gamma Interferon), IL-12 (p40/p70), IL-8, IL-17, MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein 1 alpha), IL-10, IL-1RA, IFN- γ , IL-13,

MCP-1, IL-7, IL-15, IFN- α , IL-2R, IP-10, IL-5, IL-2 (*Cytokine Human 25-plex panel*, Life Technologies). Neste experimento, amostras de sangue total foram coletadas por punção venosa dos voluntários portadores dos diferentes haplótipos (n=5 por haplótipo, totalizando 10 indivíduos) em tubos de coleta à vácuo (*Vacutainers*) contendo EDTA/K3 como anticoagulante. Antes de plaquear as células, foi realizada a separação de PBMCs de 1ml de sangue total para o ajuste de PBMCs por poço (1×10^6). O número de células viáveis foi determinado por contagem diferencial com corante Azul de Trypan 0,2% em hemocitômetro. O sangue total foi plaqueado no volume correspondente a 1×10^6 de PBMCs e assepticamente diluído em meio de cultura RPMI 1640 na proporção 1:1. Estas células foram estimuladas de acordo com a Tabela 1 por 12 h. Ao final dos períodos experimentais, as culturas foram centrifugadas (500g, 5 min à 4°C) e o sobrenadante aliquotado e armazenado a -80°C até o momento de uso nos ensaios multi-analitos. A análise dos dados foi realizada com o software que acompanha o equipamento (Luminex 200 System, Life Technologies) de forma comparativa dentro de cada grupo/haplótipo (estímulo versus ausência de estímulo) e entre os diferentes grupos/haplótipos (mesmas condições experimentais comparadas entre os diferentes haplótipos). Os experimentos foram realizados e analisados em duplicata.

Avaliação do perfil fenotípico da resposta imune (Citometria)

Alíquotas das amostras de sangue total para este experimento foram coletadas e preparadas como descrito em "*Avaliação da expressão protéica*".

Para esse experimento, as amostras de sangue total foram diluídas 1:1 em meio de cultura RPMI 1640 contendo 20% de FBS inativado por calor. Os estímulos foram

realizados por 6 horas com PMA+I para o capítulo 1 e de 72 horas de acordo com a Tabela A2, na proporção de microrganismos inativados/célula de 100:1 para o capítulo 2. Nas últimas 4 horas do período experimental, foi acrescentado o inibidor de transporte protéico monensina (Golgi-Stop, BD Biosciences). As células foram coletadas e transferidas para tubos falcon e os eritrócitos foram lisados (FACS lyse, BD Biosciences). Após a lise dos eritrócitos realizamos o bloqueio das porções Fc com 2,5µg por amostra de Fc Block (BD Biosciences) para evitarmos ligações inespecíficas do anticorpo. Em seguida as células foram marcadas com os anticorpos dos receptores de superfície (CD4, CD14) e as células foram permeabilizadas utilizando tampão contendo saponina (Cytoperm, BD Biosciences) para a marcação dos anticorpos intracelulares:

- Th1/Th2: CD4-PE-Cy7, IFNγ-FITC, IL4-PE
- Th17/Treg: CD4-PE-Cy7, IL17A-PE, FoxP3-Alexa Fluor 488
- M1/M2: CD14-PE-Cy7, IL10-PE, IL12-FITC

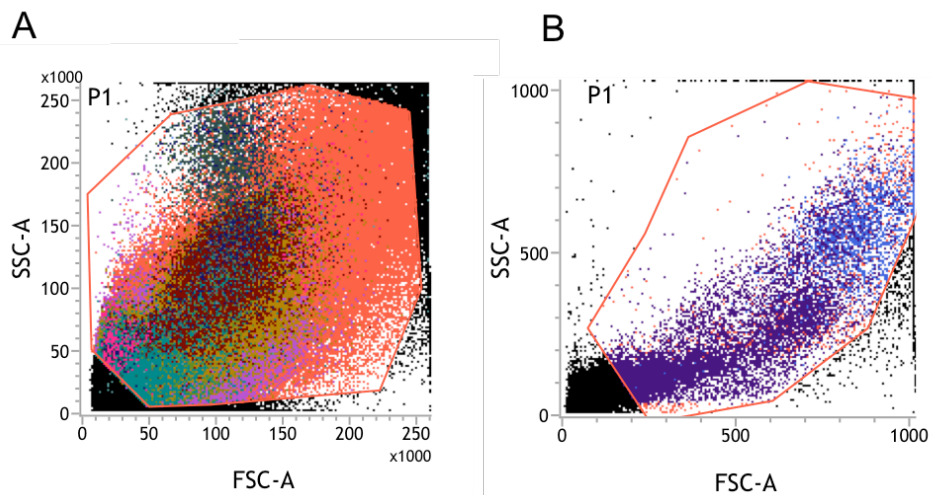
Todos os anticorpos foram obtidos comercialmente (BD Biosciences) e os controles negativos foram representados por células não marcadas, e também células marcadas com a mesma quantidade/diluição de isotipos conjugados aos mesmos fluoróforos. A aquisição de no mínimo 10.000 eventos foi realizada em citômetro de fluxo FACS Verse (BD Biosciences) e a análise dos dados efetuada com o software FACSuite (BD Biosciences).

Experimento piloto para determinação dos parâmetros das análises de Citometria de Fluxo.

Foram realizados experimentos para determinarmos os parâmetros a serem utilizados na Citometria de Fluxo. O protocolo para este experimento foi descrito acima e foi definido a partir dos resultados a seguir.

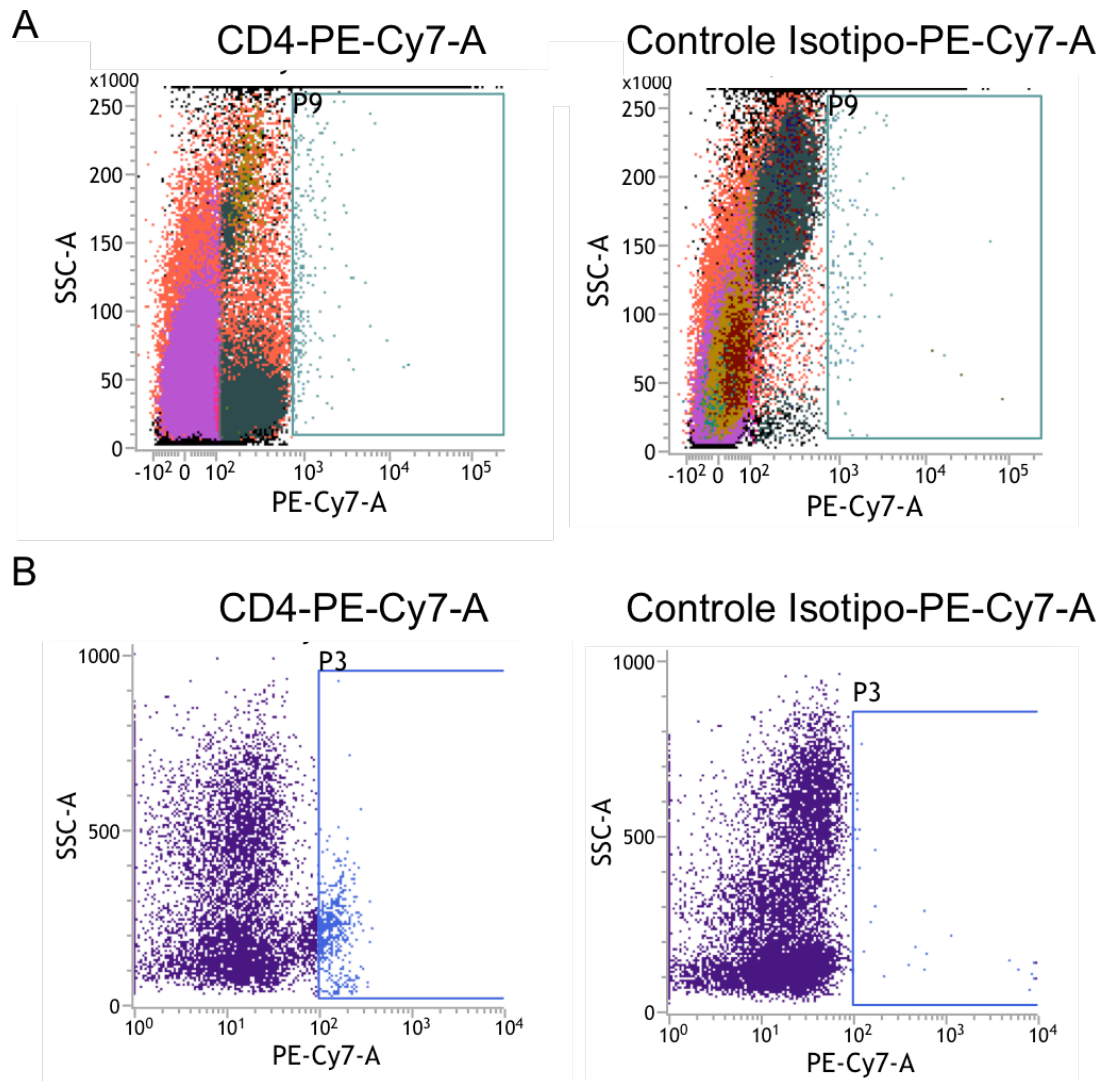
Para este experimento piloto foi coletado sangue periférico de 2 pacientes de ambos os gêneros. Buscamos otimizar a qualidade da lise dos eritrócitos (Figura A5), e o bloqueio de ligações inespecíficas (Figura A6). Também foi importante testar nosso protocolo e avaliar a eficiência dos anticorpos que caracterizaram os diferentes perfis inflamatórios (Figuras A7, A8 e A9).

Figura A5 - Otimização da lise de eritrócitos do sangue total com o tampão BD FACS Lysing. **A.** Lavagem do sangue total de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Observamos que com uma lavagem não foi o suficiente para lisar todos os eritrócitos e quando passado no citômetro foi detectada a presença de muitos debris, e a não separação das populações pelos sensores SSC x FSC. **B.** Com o objetivo de lisar os eritrócitos remanescentes foi realizada uma segunda lavagem com o tampão BD FACS Lysing. Dessa forma foi possível observar melhora na aquisição dos tipos celulares com diminuição dos debris e clareza nas populações. Assim optou-se por seguir este protocolo (2 lavagens com o Tampão FACS Lysing) para a realização dos experimentos de citometria de fluxo.



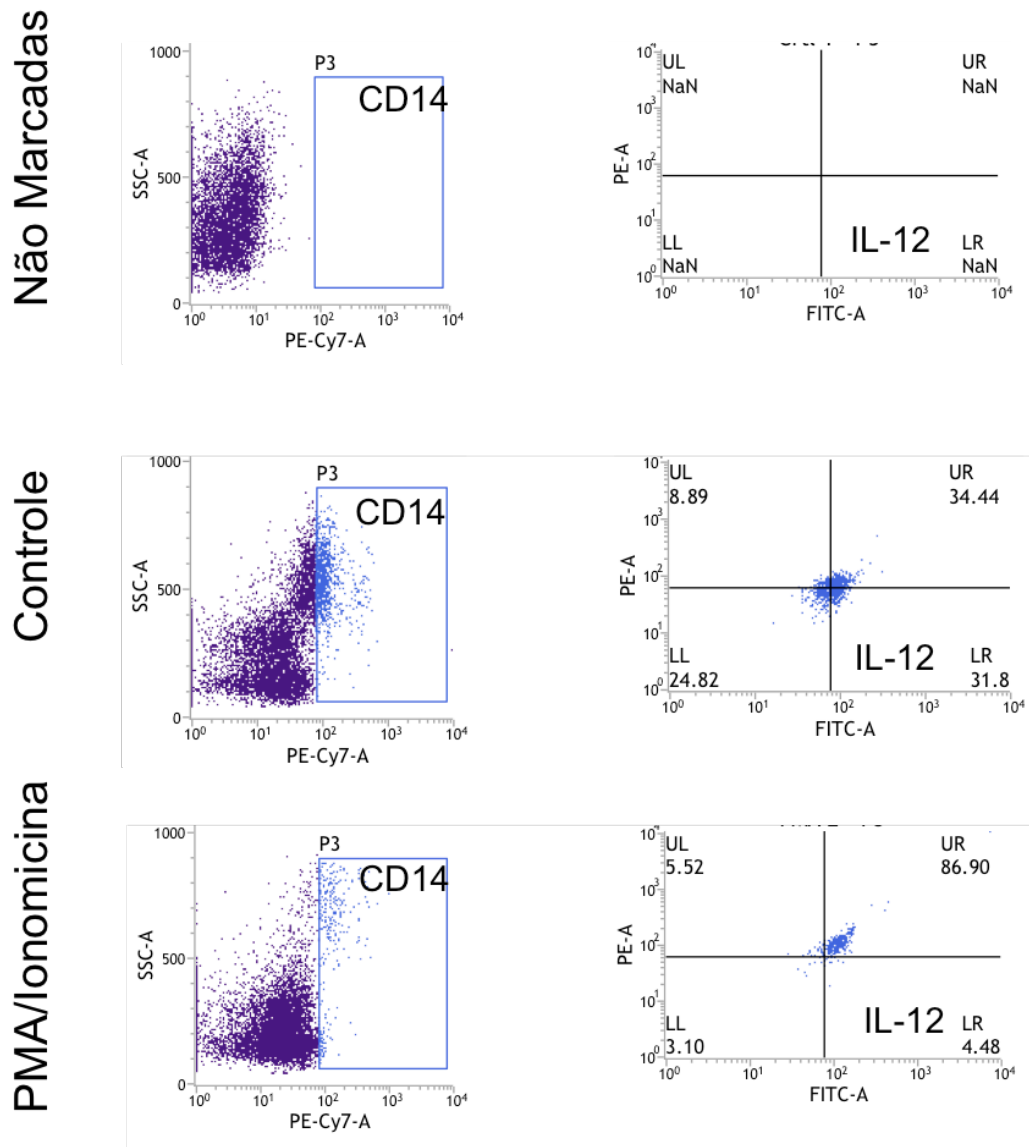
Fonte: Elaboração Própria

Figura A6 - Utilização do bloqueador de ligações Fc inespecíficas BD Fc Block. Quando realizamos o primeiro experimento piloto foi observado a marcação do Isotipo controle para PE-Cy7(A), significando que ocorreram marcações inespecíficas. Para eliminar esse problema utilizou-se o BD Fc Block. **(B)** Como resultado houve diminuição dessa marcação inespecífica como pode ser observado no Controle do Isotipo. Definiu-se que todas as amostras passarão por esse tratamento do BC Fc Block para garantir a especificidade dos anticorpos utilizados.



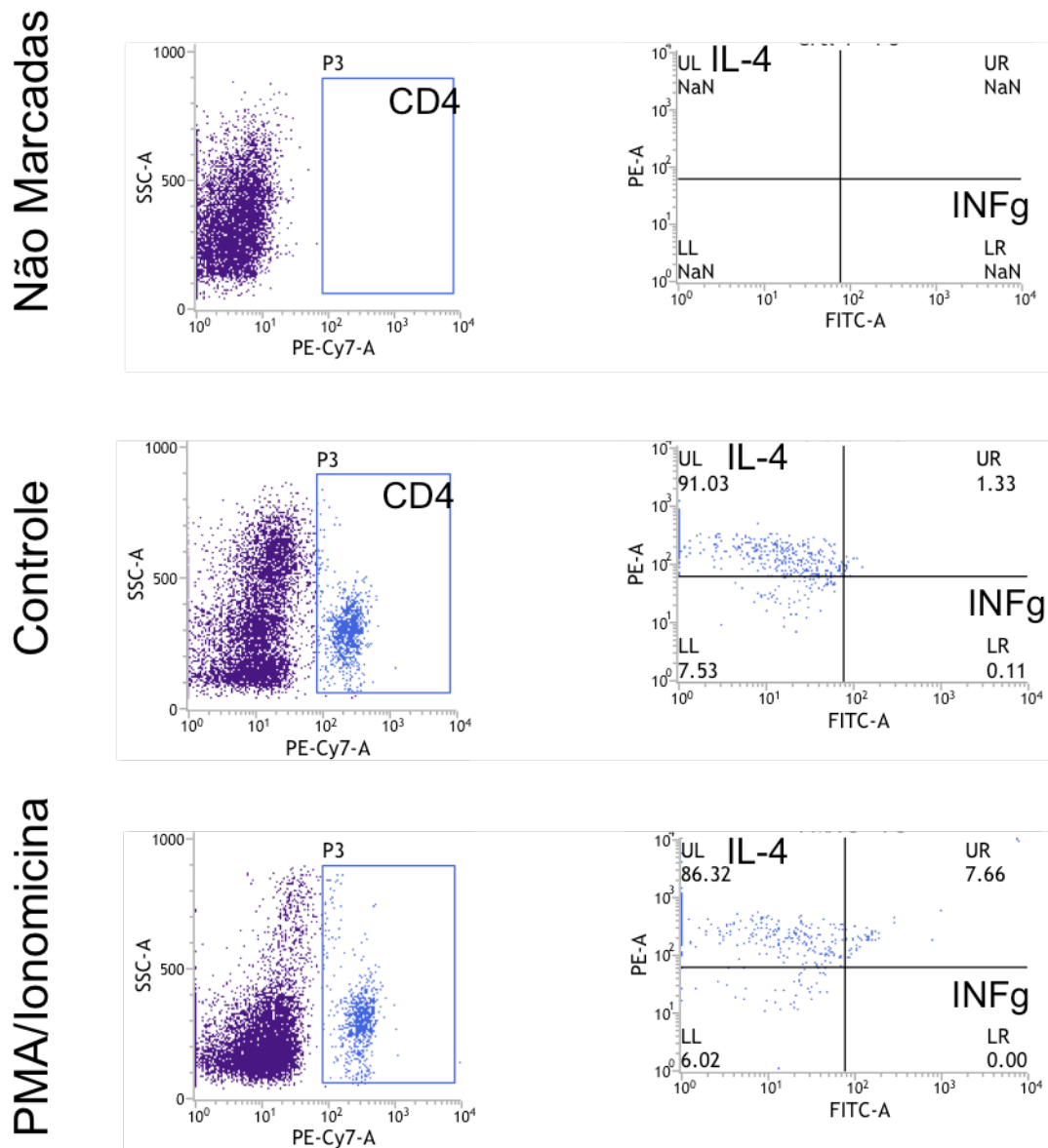
Fonte: Elaboração Própria

Figura A7 - Marcação para CD14 (monócitos) e avaliação do perfil M1 pela expressão de IL-12. Nesse experimento piloto buscamos avaliar a efetividade do anticorpo para marcação do receptor de superfície celular CD14 associado à detecção de IL-12 intracelular. Para tanto foi realizado um ‘gate’ na população CD14 positiva (PE-Cy7) para avaliar a marcação de IL-12 (FITC). Observamos que as amostras estimuladas com PMA/Ionicina induziram uma maior produção de IL-12 em comparação ao controle. Desta forma, comprovamos que foi otimizado o protocolo para detecção do perfil M1 em monócitos.



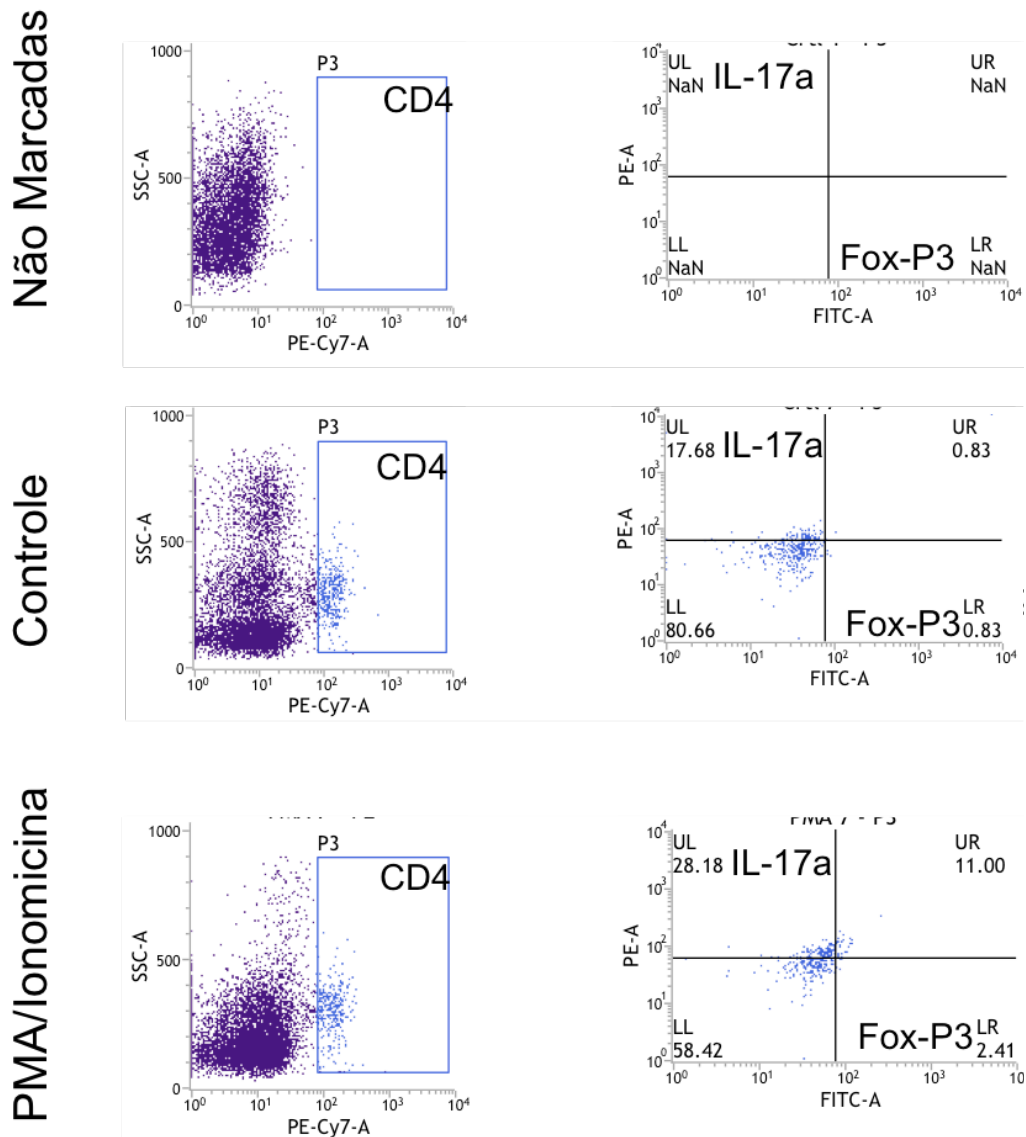
Fonte: Elaboração própria

Figura A8 - Marcação para linfócitos T CD4 e avaliação do perfil Th1/Th2. Após a realização do ‘gate’ nos linfócitos CD4 avaliamos a produção de IFN- γ (Th1) e IL-4 (Th2). Observamos que a estimulação com PMA/Ionicina diminuiu o perfil de Th2 em comparação ao controle; entretanto, o perfil Th2 foi predominante em relação ao perfil Th1. Este experimento piloto foi realizado para confirmação dos protocolos e da efetividade dos anticorpos.



Fonte: Elaboração própria

Figura A9 - Marcação para linfócitos T CD4 e avaliação do perfil Th17/Treg. Após a realização do ‘gate’ para os linfócitos T CD4 avaliamos a produção de IL-17a (Th17) e o fator de transcrição FoxP3 (que caracteriza linfócitos T regulatórios). O PMA/Ionicina é utilizado como controle positivo para essas proteínas, uma vez que aumenta sua produção funcionando como controle interno do experimento de citometria. Podemos observar que o estímulo com PMA/Ionicina aumentou o perfil Th17 de 17% (Controle) para 28%, e o perfil Treg de 0,8% (Controle) para 2,41%. Verificou-se que a realização do protocolo deste modo é eficiente para alcançar os objetivos propostos.



Fonte: Elaboração própria

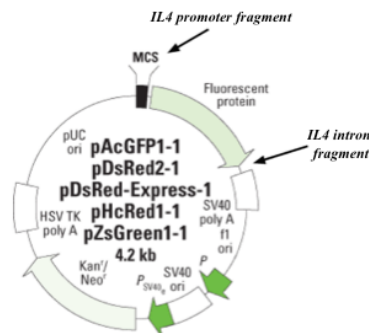
APÊNDICE B

METODOLOGIA DETALHADA DA PUBLICAÇÃO 1

Estudos utilizando gene-repórter

Os constructos utilizados foram preparados por síntese gênica pela empresa GenScript, com apoio da FAPESP (Processo 2013/17887-8), seguindo as instruções dos pesquisadores responsáveis, segundo as informações a seguir. Foram construídos vetores plasmidiais em que a expressão de gene-repórter (*green fluorescent protein*) está sob o controle do promotor proximal de *IL4* (fragmento de 2 kb: -1940 até +60). Como também faz parte dos referidos haplótipos polimorfismos existentes na região intrônica destes genes, foi avaliada a região do intron 3 de *IL4* (2,6 kb) das sequências do gene de *IL4* depositadas na base de dados do NIH/NCBI (GenBank accession numbers # M23442.1). Estas sequências foram sintetizadas juntamente com a sequência do vetor repórter de GFP (pAcGFP1-1, Clontech Lab. Inc). A sequência correspondente ao intron foi inserida imediatamente após a sequência codificadora do gene-repórter do vetor e antes do sítio poli-A (Figura B1).

Figura B1 - Representação esquemática do mapa do plasmídeo (o que foi utilizado para nossa construção foi o pAcGFP1-1 - Clontech) de gene-repórter (proteínas fluorescentes). São indicadas as posições em que estarão inseridas as sequências de pares de base correspondentes aos fragmentos do promotor (2 kb) e intron (2,6 kb) de *IL4*.



Fonte: Elaboração própria, adaptada do artigo de Han et al.¹², 2012.

Assim, obtivemos um constructo para avaliar a influência do(s) polimorfismo(s) na região promotora e/ou intrônica na expressão dos genes. Vale salientar que uma construção semelhante para avaliar uma situação equivalente foi publicada para avaliação da funcionalidade do gene *MYLK*¹².

Mutações Sítio-dirigidas

A partir do constructo TCI obtido da GenScript, realizamos ensaios de Mutagênese Sítio-dirigida para obter os outros constructos carregando outros diferentes haplótipos que estão sendo investigados neste projeto, conforme a Tabela B1.

Tabela B1 - Mutações sítio-dirigidas que foram realizadas a partir do constructo sintetizado.

Haplótipos IL4	Mutação	Primers utilizados (sentido 5' – 3')
TCI	Selvagem (constructo sintetizado)	-
<u>CCI</u>	<u>T628C*</u>	Forward: GGAGAACATTGT <u>CCCC</u> AGTGCTGG Reverse: CCAGCACTGGGG <u>G</u> ACAATGTTCTCC
<u>CTI</u>	C1184T*	Forward: CCTGATAAACTAATTGT <u>TCT</u> CACATTGTCCTGC Reverse: GCAGTGACAATGTGAG <u>A</u> CAATTAGTTTATCAGG
TTD	Selvagem	-

*sítio de mutação a partir do primeiro nucleotídeo do promotor clonado. Em negrito e sublinhado estão os nucleotídeos mutados pela reação de mutagênese sítio-dirigida.

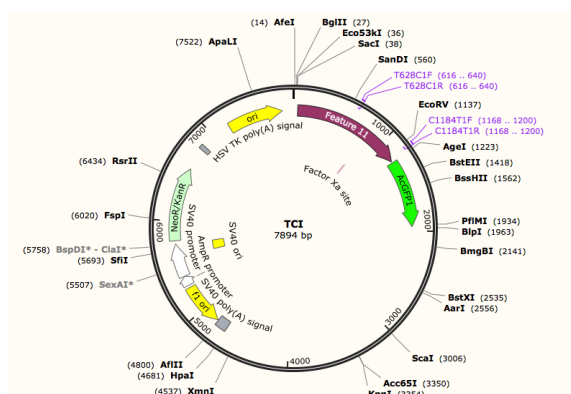
Fonte: Elaboração própria.

A partir do constructo sintetizado TCI (Figura B2), fizemos 2 mutações sítio-dirigidas para obtermos as construções CCI e CTI. Estas mutações sítio-dirigidas foram criadas no constructo (vetor) utilizando primers contendo as bases nitrogenadas a serem modificadas. Os primers foram desenhados por meio do programa SnapGene Viewer (Tabela B1). A reação da polimerase em cadeia (PCR) para a mutagênese sítio-dirigida foi realizada com o kit Phusion (Biolabs). A reação de polimerização foi conduzida separadamente com o primer forward e com o primer reverse, contendo: 0,3 µL de *Phusion* 2,000 U/mL, 0,25 µL de MgCl₂ 1,5 mM, 0,75 µL de dNTP (contendo 100 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 5,0 µL de Buffer HF 5x, 0,4 µL de primer (40 pmol), 500 ng de DNA molde (plasmídeo contendo a sequência a ser modificada) e água até completar o volume de 25 µL. Em paralelo à reação de mutagênese sítio-dirigida, foi

preparada outra reação com os mesmos componentes, entretanto, na ausência da enzima polimerase, a qual foi utilizada como controle negativo da mutagênese. As amostras foram colocadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) e as condições da reação foram: *hotstart* de 98 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 s, anelamento a 50 °C por 30 s e polimerização a 72 °C por 5 min e um ciclo final de polimerização a 72 °C por 5 min. Após a reação da PCR, o produto de cada reação, sintetizado separadamente com o oligonucleotídeo *forward* e o *reverse* foi reunido no mesmo microtubo de 200 µL, elevando a temperatura do meio reacional a 98 °C e depois o anelamento entre as fitas foi realizado pela redução gradativa da temperatura a cada 1 min, até 37 °C.

O DNA plasmidial molde foi digerido com *DpnI* (20 U/µL; New England Biolabs), em uma reação contendo o produto de anelamento das PCRs e 5 µL de tampão CutSmart (New England Biolabs) e incubada overnight a 37 °C. Após a digestão, o produto plasmidial foi transformado em *Escherichia coli* competente.

Figura B2 - Representação esquemática do constructo TCI dada pelo software SnapGene.



Fonte: Elaboração própria

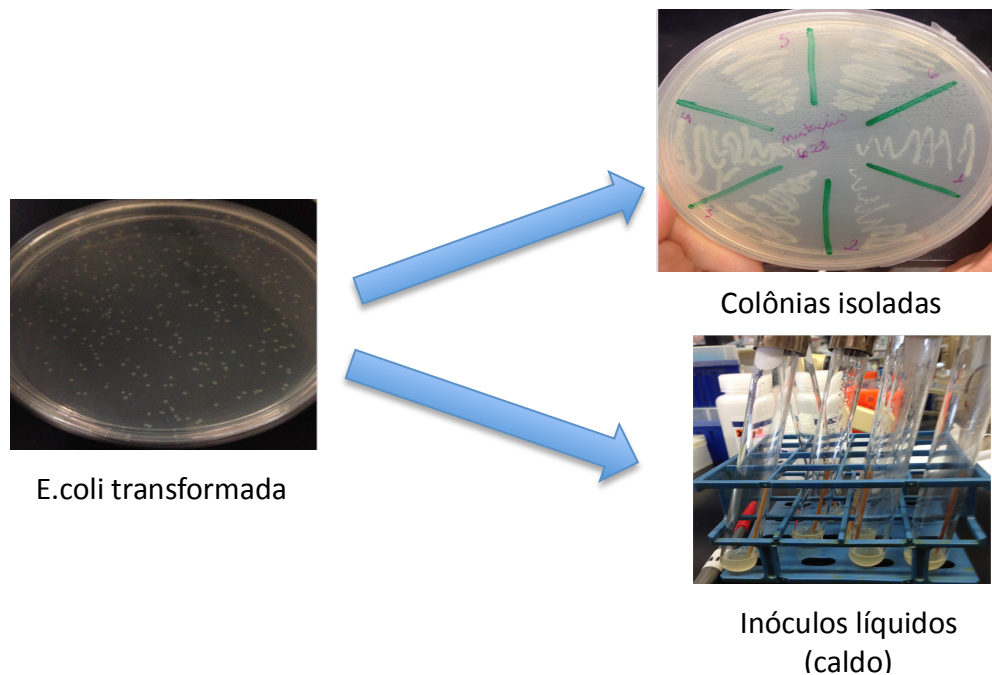
Transformação de *E.coli*

O produto dessa digestão foi transformado em *E. coli* DH5 α competente através de choque térmico. Para a transformação, foram adicionados em um microtubo 20 μ L da reação de digestão, 80 μ L de tampão de transformação (10% de solução dos sais: KCl 1 M, CaCl₂ 0,3 M, MgCl₂ 0,5 M; 15% de solução m/v de polietilenoglicol 4000 10% e água q.s.p.) e 100 μ L da bactéria competente. O tubo foi incubado no gelo por 30 min e, em seguida, incubado a 42 °C por 2 min. Foi adicionado, em cada microtubo, 1 mL de meio LB (Lúria-Berthani) seguindo incubação a 37° C por 1 h. Os microtubos foram centrifugados por 1 min na máxima velocidade. O pellet gerado foi ressuscitado em 100 μ L do sobrenadante que foi plaqueado em meio LB contendo canamicina (25 μ g/ μ L) e as placas foram incubadas por 12 a 16 horas a 37° C.

O crescimento de colônias nas placas da reação e do controle negativo foram analisados. Quando o crescimento de colônias na placa da reação foram $\geq 5x$ o controle negativo, significou que a mutagênese foi eficiente e, portanto, deve-se prosseguir com a identificação de clones mutagenizados. Dessa placa transformada, foram selecionados 8 colônias isoladas, as quais foram inoculadas em nova placa de LB + canamicina e no mesmo meio em caldo (Figura B3), com nova incubação a 37° C por 12 a 16 horas.

A preparação plasmidial das culturas utilizou o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) conforme protocolo do fabricante, e foi realizada a partir dos inóculos líquidos.

Figura B3 - Representação da transformação da *E.coli* e dos inóculos.



Fonte: Elaboração própria.

Preparação plasmidial - kit Qiaprep Spin Miniprep

A partir dos inóculos líquidos, fizemos a preparação dos diferentes plasmídeos através do Kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen), seguindo o protocolo do Kit. Um volume de 3 mL de cultura foi decantado em microcentrífuga (Eppendorf 5415D) a 14.000 g por 1 min. O pellet foi ressuspenso em 250 μ L de tampão P1 contendo RNase e depois foram adicionados 250 μ L de tampão de lise P2. O microtubo foi invertido por 4 a 6 vezes e foram adicionados 350 μ L de tampão de neutralização N3. Repetiu-se a homogeneização por inversão e o microtubo foi centrifugado a 14.000 g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para a coluna QIAprep acoplada sobre um tubo coletor e centrifugado por 1 min a 14.000 g. O filtrado foi descartado, a coluna foi lavada com 750

μL de tampão PE e submetida a nova centrifugação, repetindo-se a mesma por 1 min para remoção de resíduos do tampão de lavagem. A coluna foi transferida para um tubo de centrífuga, foram adicionados 50 μL do tampão de eluição EB, a coluna foi incubada à temperatura ambiente por 1 min e depois, centrifugada por 1 min a 14.000 g para eluição do DNA plasmidial. Após eluirmos o DNA plasmidial, quantificamos essas amostras com o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher) para posterior emprego de 400 ng de cada amostra na reação de PCR de sequenciamento.

Para as reações de PCR para sequenciamento foi utilizado o kit Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Para a confirmação de cada uma das mutações foram utilizados oligonucleotídeos diferentes, apresentados na Tabela B2. Foram misturados 1 μL de mix Big Dye, 3,5 μL do tampão de sequenciamento (5X), 1 μL do oligonucleotídeo iniciador adequado (3,2 μM), 4 μL do DNA plasmidial (100 ng/ μL) e água q.s.p. para o volume final de 20 μL . As condições de amplificação foram: hot start de 96° C por 1 min, seguida de 25 ciclos de 96° C por 10 s, 43° C por 5 s, 60° C por 4 min e extensão final de 60° C por 5 min. Em seguida à amplificação, as amostras foram precipitadas com o kit Big Dye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante, mantendo-as na ausência de luminosidade. Para cada amostra a ser sequenciada, foram utilizados 10 μL de solução X-Terminator™, 45 μL de solução SAM e 10 μL da PCR. As amostras foram submetidas a homogeneização em vórtex por 30 min e centrifugadas por 2 min a 1000 g em 4° C. O sequenciamento automático foi realizado com 20 μL de cada amostra no sequenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems).

Tabela B2 - Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para a PCR de sequenciamento.

Mutação	Primers utilizados (sentido 5' – 3')	Região de anelamento
T628C	GCTTCCTTATGGGTAAGGACC	De 525 a 545 pares de base a partir do início do promotor
C1184T	TCACCTGATACGACCTGTCC	De 576 a 595 pares de base a partir do início do promotor

Fonte: Elaboração própria.

Com os dados do sequenciamento, a qualidade e confiabilidade foram verificadas com o programa Sequence Scanner v 2.0 (Applied Biosystems). Com as sequências de boa qualidade obtidas foi realizado um alinhamento múltiplo global com a ferramenta ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) em comparação à sequência original (também chamada de selvagem, ou wt), com 800 nucleotídeos a partir da região de anelamento dos primers utilizados na reação de sequenciamento, o que possibilitou a visualização das mutações.

Dessa forma, a partir do constructo sintetizado TCI (Figura B2), fizemos a primeira mutação sítio-dirigida para obtermos a construções CCI. Após todas as etapas descritas acima, podemos verificar através do resultado do sequenciamento, que o alelo T presente na sequência wt (sequência selvagem) foi mutado para alelo C (presente nas sequências R5, R7 e R2, grifados em amarelo) (Figura B4), comprovando a eficácia da mutagênese sítio-dirigida.

Figura B4 - Resultado do sequenciamento referente a 1º mutação sítio dirigida. A partir do constructo TCI obtivemos o constructo CCI.

```

wt    61  ACGACCTGTCCTTCTCAAAACACTAAACTTGGGAGAACATTGTTCCCCAGTGCTGGGGTA
R5    10  ACGACCTGTCCTTCTCAAACACTAAACTTGGGAGAACATTGTTCCCCAGTGCTGGGGTA
R7     5  ACGACCTGTCCTTCTCAAAACACTAAACTTGGGAGAACATTGTTCCCCAGTGCTGGGGTA
R1    10  ACGACCTGTCCTTCTCAAAACACTAAACTTGGGAGAACATTGTTCCCCAGTGCTGGGGTA
R3     1  -----CTAAACTTGGGAGAACATTGTTCCCCAGTGCTGGGGTA
R6     5  TACCAACTGTCCTTCTCAAACACTAAACTTGGGAGAACATTGTTCCCCAGTGCTGGGGTA
R2     7  ACGACCTGTCCTTCTCAAAACACTAAACTTGGGAGAACATTGTTCCCCAGTGCTGGGGTA

```

Fonte: Elaboração própria.

Para a realização da segunda mutagênese sítio-dirigida, a qual queremos obter o haplótipo CTI, usamos o plasmídeo R2 que obtivemos a partir da 1º mutagênese sítio-dirigida (CCI). Novamente todas as etapas desde a PCR para mutagênese sítio dirigida, até o sequenciamento foram realizadas como descritas acima. Com os resultados do sequenciamento verificamos que o alelo C (mostrado na figura na sequência wt) foi mutado para o alelo T (sequência R2, R3, R6, R1, R5, grifados em rosa), (Figura B5), e dessa forma obtivemos o haplótipo CTI, confirmando a eficiência da mutagênese.

Figura B5 - Resultado do sequenciamento referente a 2º mutação sítio dirigida, que a partir do alelo C obtivemos o alelo T.

```

wt    601  ACTAATTGCTCACATTGTCACCTGCAAATCGACACCTATTAGGATCCACCGGTGCGCCACC
R2    550  ACTAATTGCTCACATTGTCACCTGCAAATCGACACCTATTAGGATCCACCGGTGCGCCACC
R3    550  ACTAATTGCTCACATTGTCACCTGCAAATCGACACCTATTAGGATCCACCGGTGCGCCACC
R6    553  ACTAATTGCTCACATTGTCACCTGCAAATCGACACCTATTAGGATCCACCGGTGCGCCACC
R1    546  ACTAATTGCTCACATTGTCACCTGCAAATCGACACCTATTAGGATCCACCGGTGCGCCACC
R5    543  ACTAATTGCTCACATTGTCACCTGCAAATCGACACCTATTAGGATCCACCGGTGCGCCACC
R8    549  ACTAATTGCTCACATTGTCACCTGCAAATCGACACCTATTAGGATCCACCGGTGCGCCACC

```

Fonte: Elaboração própria.

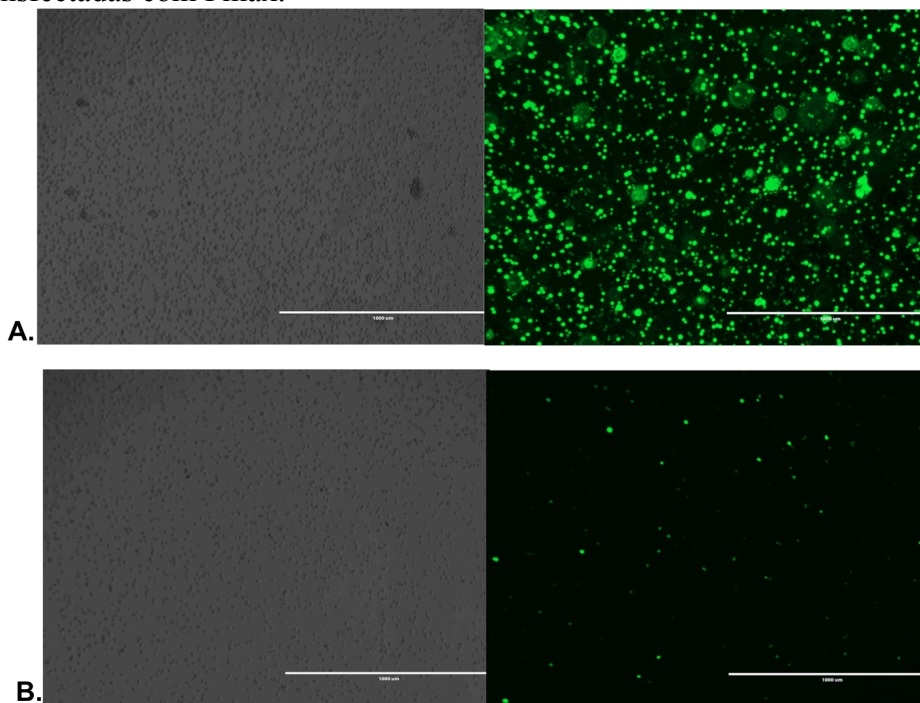
A partir dos plasmídeos obtidos pelas mutagêneses, está sendo transfectadas as células JM (Linfócitos T humanos) e os efeitos dos diferentes haplótipos na região

promotora e/ou intrônica estão sendo avaliados pela expressão do gene repórter utilizando citometria de fluxo.

Experimento piloto para determinação do tipo celular para otimização de transfecção

Experimentos foram realizados para determinação do tipo celular a ser utilizado para a transfecção e a otimização do sistema Neon (Invitrogen Corp.) em células JM (linfócitos T de humanos) e U937 (monócitos humanos) com um plasmídeo utilizado para testar eficiência de transfecção pMAX-GFP (10 μ g). Após 24 horas da transfecção nesses tipos celulares, verificamos a eficiência de 90% da transfecção nas células JM (Figura B6).

Figura B6 - Transfecção e a otimização do sistema Neon, (Invitrogen Corp.). Células 24 horas após a transfecção; A. Células JM transfectadas com Pmax; B. Células U937 transfectadas com Pmax.



Fonte: Elaboração própria.

Transfecção dos diferentes plasmídeos nas células

Esses vetores plasmidiais mutagenizados (constructos dos diferentes haplótipos) foram transfectados por eletroporação/reagentes catiônicos (sistema Neon, InvitrogenCorp) em células JM (linfócitos T Humanos) e os efeitos dos diferentes haplótipos na região promotora e/ou intrônica foram avaliados pela expressão do gene repórter utilizando citometria de fluxo.

Utilizando a transfecção por sistema Neon, células JM em cultivo foram centrifugadas a 400 g por 5 min, lavadas com PBS 1x, e na concentração padronizada para este tipo celular (2×10^7 cels/mL) são ressuspensas em tampão Buffer R (Kit Neon, InvitrogenCorp). Dessa suspensão, 100 μ l foram transferidos para um novo microtubo e adicionada a concentração de 10 μ g de plasmídeo. Os parâmetros para JM foram ajustados no equipamento: voltagem 1350 V, tempo 10 ms e pulso 3.

Após este procedimento, adicionou-se o conteúdo da ponteira utilizada na eletroporação em um poço previamente incubado com meio de cultura RPMI 1840 suplementado com 10% FBS sem antibiótico. Os estímulos com PMA+I, IL-1b e IL-4 com anti IL-12 para polarização do perfil Th2 foram realizados 24 horas após o procedimento de transfecção, e os resultados da expressão de GFP foi avaliado 24 horas após os estímulos por citometria de fluxo. Todos os experimentos foram feitos em 3 experimentos diferentes e em triplicada.

APÊNDICE C

METODOLOGIA DETALHADA DA PUBLICAÇÃO 2

Metodologia de cultivo *Pg* e *Aa*

Todas as cepas foram mantidas em caldo BHI (brain heart infusion) contendo 20% de glicerol em freezer a -80°C . As amostras de *P. gingivalis* (*Pg*) foram cultivadas em placas de ágar sangue (sangue desfibrinado de carneiro) suplementado com hemina (0,5 mg/ml) e menadione (1 mg/ml) (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) e em jarra sob atmosfera de anaerobiose (GasPack™ EZ Anaerobe Container System with Indicator, BD) em estufa de CO_2 a 37°C durante 1 semana antes de cada coleta de sangue.

Após esses 7 dias, para obter as culturas de *P. gingivalis* em fase exponencial de crescimento, a amostra foi cultivada em caldo triptone soja (TSB) suplementado com menadione (1mg/ml) e baixa concentração de hemina ($1\ \mu\text{g ml}^{-1}$) por 24 horas, seguindo-se da diluição 1:40 no mesmo meio de incubação até atingir a $\text{DO}_{495\text{nm}} \sim 0,5$.

As amostras de *A. actinomycetemcomitans* foram cultivadas em placas de ágar com meio TSB e em jarra sob atmosfera de anaerobiose (GasPack™ EZ Anaerobe Container System with Indicator, BD) em estufa a 37°C durante 48 horas. Para obter culturas de *A. actinomycetemcomitans* em fase exponencial de crescimento, a amostra foi cultivada em caldo TSB e incubada durante 24 horas em jarra com atmosfera de 10% de CO_2 dada pelo envelope GasPak™. Após este intervalo de tempo, a concentração da suspensão bacteriana foi ajustada por mensuração em espectrofotômetro à $\text{DO}_{495\text{nm}}$ para $\sim 1,0$; seguindo-se à diluição 1:40 em caldo TSB e incubação por 7 horas.

Para os experimentos de expressão gênica e multiplex, as bactérias foram utilizadas vivas na proporção de 1:100 célula/bactéria. Para o experimento de citometria de fluxo as bactérias foram inativadas por calor em banho-maria à 65° C por 1 hora.

ANEXO A**Comitê de Ética e Pesquisa**

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE HAPLÓTIPOS NOS GENES INTERLEUCINA 4 E INTERLEUCINA 8

Pesquisador: Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa na qual esteja prevista a dissociação irreversível dos dados dos participantes da pesquisa.);

Versão: 3

CAAE: 18527813.7.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 478.616

Data da Relatoria: 03/12/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto está bem detalhado.

Objetivo da Pesquisa:

Determinar a funcionalidade dos diferentes haplótipos nos genes IL4 e IL8 a partir de células coletadas de pacientes, investigar possíveis diferenças na resposta imune inata e adaptativa; e a partir de plasmídeos recombinantes construídos artificialmente contendo os alelos que compõe os diferentes haplótipos (construtos), investigar o papel específico dos polimorfismos na regulação da expressão gênica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: o paciente será submetido à coleta de sangue, sem portanto não correr riscos de contaminação ou infecção do paciente, uma vez que serão utilizados materiais estéreis e descartáveis, além de todos os cuidados com o paciente.

Benefícios: poderá fornecer ao indivíduo informação sobre sua suscetibilidade genética à doença periodontal crônica; poderá orientar quanto a maiores cuidados referentes à higienização oral e acompanhamento clínico; todos os voluntários receberão profilaxia profissional e poderá também verificar se a carga genética do paciente influencia na expressão das suas citocinas inflamatórias.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 478.616

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de grande importância pois poderá fornecer informações sobre a suscetibilidade genética à doença periodontal crônica., verificando-se a carga genética do paciente pelos diferentes haplótipos dos genes que influenciam a expressão de suas citocinas inflamatórias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as solicitações foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Não autorizo a publicação deste trabalho até 28/03/2018.

(Diretos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 28 março de 2016.

GIOVANA ANOVAZZI