

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 22/09/2019.



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



SUZANE CRISTINA PIGOSSI

**INFLUÊNCIA DE HAPLÓTIPOS NO GENE *INTERLEUCINA 8* EM CÉLULAS
COM FUNÇÃO IMUNE**

ARARAQUARA

2017



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



SUZANE CRISTINA PIGOSSI

**INFLUÊNCIA DE HAPLÓTIPOS NO GENE *INTERLEUCINA 8* EM CÉLULAS
COM FUNÇÃO IMUNE**

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

2017

Pigossi, Suzane Cristina

Influência de haplótipos no gene Interleucina 8 em células com função imune / Suzane Cristina Pigossi .-- Araraquara: [s.n.], 2017
144 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

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

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

SUZANE CRISTINA PIGOSSI

**INFLUÊNCIA DE HAPLÓTIPOS NO GENE *INTERLEUCINA 8* EM CÉLULAS
COM FUNÇÃO IMUNE**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

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

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Marinella Holzhausen Caldeira

3º Examinador: Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin

4º Examinador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

5º Examinador: Prof^a. Dr^a. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Araraquara, 22 de Setembro de 2017.

DADOS CURRICULARES

SUZANE CRISTINA PIGOSSI

Nascimento 22 de Setembro de 1989 – Rio Claro – SP

Filiação Antonio Pigossi

Sandra Aparecida Buccioli Pigossi

2007 - 2011 Curso de Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr Universidade Estadual Paulista – UNESP

2012 - 2014 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 Periodontia – Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr Universidade Estadual Paulista – UNESP.

2014 - 2017 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia – Nível Doutorado - Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Dedico esse trabalho...

Aos ***meus pais***, Antonio Pigossi, Sandra Ap. B. Pigossi, pois sem eles, NADA seria possível. Agradeço por todo amor, carinho e dedicação pela nossa família desde SEMPRE. Pela educação e ensinamentos que levarei para toda minha VIDA.

Ao ***meu irmão***, Vitor Pigossi, um anjinho nas nossas vidas, por toda paciência e companheirismo, estaremos juntos para sempre.

Aos ***meus avôs***, João Buccioli e Ilda de Souza Buccioli, pelo amor incondicional por nossa família e por estarem SEMPRE presentes.

Aos ***meus tios***, Adilson Nodari e Solange Buccioli Nodari, por me amarem como filha, estando sempre presentes me apoiando em todas as escolhas.

Agradeço especialmente...

À **DEUS** por todas as coisas boas que tenho na minha vida. Por iluminar meus dias, minha família e meus amigos.

Minha orientadora, **Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga**, pela dedicação ao nosso grupo de pesquisa, por me apoiar nas minhas escolhas acadêmicas e principalmente por estar sempre disposta a fazer o melhor.

Meu co-orientador, **Prof. Dr. Carlos Rossa Jr**, pela sua dedicação a pesquisa, por compartilhar seu conhecimento e por estar presente em todas as etapas desse trabalho. Agradeço também pela sua dedicação ao Programa de Pós Graduação em Odontologia no período em que foi coordenador do curso.

Minha amiga, **Livia Sertori Finoti**, pelo seu apoio em TODOS os momentos. Minha irmã de coração e uma das pessoas mais maravilhosas e importantes da minha vida. Não importa a distância, as dificuldades e o tempo, sempre estaremos juntas!

Minha amiga-irmã, **Livia Amato**, simplesmente por TUDO! Por estar do meu lado desde o começo em todos os momentos, escutando e apoiando todas as minhas escolhas, pelo amor e carinho incondicional e por ser essa pessoa maravilhosa que fez e sempre fará parte da minha vida.

Minha amiga periodontista, **Jéssica Hayakawa**, por estar do meu lado em todos os momentos. Sua amizade foi o melhor presente que a especialização me deu. Agradeço pelos momentos de alegria que compartilhamos juntas e por me escutar SEMPRE, mesmo estando longe. Tenho certeza que nossa amizade será p vida toda.

Minhas amigas, **Livia Bueno, Maira Cristo Daitx, Thamires Reis, Priscila Quintino, Leticia Britschgy, Livia Britschgy, Michelle Souza e Mariana Reis**, companheiras de SEMPRE presentes mesmo quando a correria do dia-a-dia nos impede de estarmos juntas, por todas as risadas, histórias e momentos especiais que compartilhamos. Sem dúvidas são as MELHORES amigas que eu poderia ter.

Ao **Heitor Colangelo**, por entrar na minha vida e ter se tornado alguém tão especial. Obrigada pelos bons momentos que passamos juntos e por me apoiar sempre nas minhas escolhas.

Minha amiga, **Flavia Cera**, uma pessoa iluminada que mesmo longe, está sempre presente, que sempre que nos encontramos é diversão na certa. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Meu amigo, **Cassio Rocha**, pela parceria desde 2007. Por estar sempre disposto a me ajudar compartilhando seu conhecimento. Agradeço pelos momentos divertidos que passamos juntos. Que nossa amizade permaneça por muitos anos.

Minha amiga, **Isabela Manzolli**, por estar sempre disposta a me ajudar e me escutar sempre que preciso. Por ser essa funcionária nota mil, essencial para o funcionamento da clínica de Periodontia. Agradeço e admiro sua dedicação.

Minha amiga, **Luana Verzola**, por todos os momentos que passamos juntas. Admiro muito você como pessoa e profissional. Agradeço por você fazer parte da minha vida. Agradeço também o **Mario Verzola**, por estar sempre me dar conselhos e pelos momentos divertidos que passamos juntos.

Minha amiga, ***Giovana Anovazzi Medeiros***, primeiramente pela sua dedicação a nossa amizade desde que nos conhecemos. Também agradeço pela sua ajuda durante cada etapa do desenvolvimento desse trabalho. Sua participação foi essencial.

Ao **Marcell Medeiros**, pela parceria no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço sua disponibilidade para nos ensinar as metodologias aqui propostas. Admiro muito seu conhecimento e dedicação à pesquisa.

Minha companheira, ***Kahena Soldati***, que entrou na minha vida esse ano e se tornou uma pessoa muito especial. Agradeço pelo seu companheirismo diário. Tenho certeza que passaremos momentos muito especiais juntas. Obrigada pela amizade.

Minha amiga, ***Andressa Nogueira***, que está sempre disposta a me ajudar sempre que preciso. Pelos momentos felizes que passamos juntas. Você é uma pessoa muito especial.

Minha dupla de especialização, ***Carolina Marcantonio***, que se tornou uma pessoa muito especial para mim. Agradeço pelos momentos que passamos juntas no curso de especialização e por você ser essa pessoa tão carinhosa e especial.

A minha companheira de laboratório, ***Thamiris Cirelli***, pela amizade e companheirismo dentro e fora da faculdade. Admiro você pela profissional que está se tornando e tenho certeza que você conquistará muitas coisas boas na sua vida pessoal e profissional.

Minha amiga, ***Mayara Terenzi***, que me apoia sempre em cada conquista mesmo estando longe. Admiro você pela pessoa e profissional que você é. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Ao meu amigo, ***Rafael Nepomuceno***, pelos momentos divertidos que passamos juntos e por sempre estar disposto a me ajudar quando preciso.

As minhas companheiras de laboratório, **Profa. Ticiano Capote, Fernanda Coelho, Sâmia Tfaile, Maria Amélia Tamagnini e Sâmara Tfaile** por fazerem os dias de trabalho serem mais leves e por me ajudarem sempre que preciso. Tenho sorte de fazer parte desse grupo de pesquisa.

Aos meus amigos **Diego de Paula, Ana Paula Poli e Ana Paula Picco**, o melhor e maior presente que o Ballet me deu. Obrigada pelos momentos felizes que passamos juntos. Vocês tem um lugar especial no meu coração.

Minha amiga, **Margot Fabiana Pereira**, companheira de colégio presente até hoje na minha vida, por toda ajuda, apoio e carinho desde sempre.

Meus amigos de Pós Graduação, **Cindy Perez, Vinicius Paiva, Tiago Fonseca, Laurie Garcia, Lélis Nicoli, Adriana Cabrera, Mariana Cominotte, Laura Gonzalez, Bruno Segnini, Maurício Tinajero, Paula Macedo, Jackeline Tsurumaki e Guilherme Oliveira** pelos momentos de descontração, alegria e apoio nesses anos de convivência e trabalho.

Minha amiga, **Ana Paula Faloni**, uma das melhores professoras que conheci. Admiro sua dedicação ao trabalho e aos seus alunos. Obrigada pelos conselhos e apoio sempre.

Minhas amigas “químicas” **Sybele Saska e Larissa Mendes** pela parceria nos trabalhos com biomateriais e pela amizade. Tenho muita admiração pela dedicação que vocês têm ao trabalho. Espero que possamos trabalhar sempre juntas.

À **Família Pigossi e Chagas** por estarem sempre presentes na nossa vida nos apoiando nas dificuldades e comemorando as conquistas.

À **Família Rosa**, minha família de coração e companheiros desde sempre, pelo apoio nos momentos difíceis e por encherem nossas vidas de felicidade. A minha amiga, **Tais**

Fini Rosa, que mesmo distante está sempre presente nos meus pensamentos, parceiras desde pequenas estaremos sempre juntas.

Minha tia de coração, ***Vera Sertori Finoti***, a pessoa mais guerreira que conheci até hoje, pela preocupação, dedicação, carinho, amor e por ser essa pessoa única que alegra nossas vidas. Tia Vera você é um exemplo.

Aos meus tios ***Vladimir e Josilene Buccioli*** pelo apoio, carinho e amor que sempre tiveram por mim e por nossa família.

Aos meus amigos de especialização, ***Jessica Hayakawa, Naiara Gil, Pedro Yarid, Renan Oliveira e Raphael Jurca*** pelos momentos especiais que compartilhamos juntos. Vocês fazem muita falta e moram no meu coração. Obrigado por fazerem parte da minha vida.

Agradeço...

A ***Faculdade de Odontologia de Araraquara***, na pessoa de sua Diretora, Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato, e do Vice-Diretor, Prof. Dr. Edson Alves de Campos, responsável pela minha formação e pela estrutura oferecida para a realização dessa pesquisa.

O ***Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia***, Área de Periodontia, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, e a todos os ***docentes do Curso de Pós-Graduação do Programa de Periodontia***, sempre dispostos a ensinar, pela disponibilidade e dedicação ao programa e aos seus alunos.

Aos ***docentes do curso de Especialização em Periodontia***, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli e Prof. Dr. José Eduardo César Sampaio que me tornaram especialista e pela dedicação ao curso.

Ao ***Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior*** pela oportunidade de ter participado do Curso de Especialização em Implantodontia e pela parceria nos artigos científicos.

Ao ***Prof. Dr. Claudio Marcantonio*** pela parceria nos artigos científicos.

À ***Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP***, pelo apoio financeiro. Processo FAPESP Número: 2014/04638-2.

Aos funcionários da Disciplina de Periodontia, ***Isabela, Claudinha e Suleima***, sempre dispostos a ajudar, pelo carinho e apoio aos alunos.

Aos ***funcionários do Departamento de Morfologia*** pelo apoio na execução desse trabalho.

Aos funcionários da *Seção de Pós-Graduação*, pela paciência e dedicação aos alunos.

Aos *funcionários da Biblioteca* pela disposição de sempre.

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

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

Pigossi SC. Influência de haplótipos no gene *Interleucina 8* em células com função imune [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

Estudos realizados por nosso grupo investigaram polimorfismos no gene *Interleucina 8 (IL8)* em 500 indivíduos com e sem periodontite e identificaram que o haplótipo ATC/TTC conferiu 2 vezes maior suscetibilidade à doença periodontal crônica (DP) em comparação com o haplótipo ATT/TTC. Estudos clínicos revelaram que indivíduos portadores do haplótipo no gene *IL8* associado à DP, mesmo com baixo desafio microbiano, desenvolviam periodontite de maneira mais exacerbada quando comparados aos indivíduos portadores do haplótipo não associado à DP. No entanto, a funcionalidade biológica desses haplótipos no gene *IL8* ainda não foi investigada por meio de controlados ensaios *in vitro*. A proposta deste estudo é avaliar a funcionalidade dos haplótipos no gene *IL8* em células imunes, incluindo a investigação por meio da regulação da expressão do gene repórter presente em plasmídeos recombinantes construídos artificialmente (constructos). Foi coletado sangue periférico de pacientes que carregam cada haplótipo e estimulados com mediadores inflamatórios e bactérias periodontopatogênicas para se avaliar a expressão gênica (mRNA, RT-qPCR), proteínas secretadas (Multiplex), perfil fenotípico celular (Citometria de fluxo), fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos (Citometria de fluxo) e potencial de migração de linfócitos e neutrófilos. Constructos contendo cada haplótipo foram transfectados em linfócitos T humanos (células JM) e a expressão do gene repórter GFP foi avaliada utilizando citometria de fluxo. Os indivíduos portadores do haplótipo suscetível (ATC/TTC) apresentaram maiores níveis de IL-8, TNF- α (mRNA e proteína), IL-1 β , IL-2R, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES (proteína). Polarização significativamente maior para o fenótipo Th1/M1 foi observada para o haplótipo

suscetível enquanto que o haplótipo não suscetível (ATT/TTC) foi associado a uma resposta atenuada aos periodontopatógenos, com inclinação para o fenótipo Treg. Uma porcentagem mais elevada de macrófagos produtores de ROS tende a ocorrer em indivíduos portadores do haplótipo suscetível, assim como maior migração de neutrófilos após estímulo com IL-8 nesses indivíduos. Em relação à análise dos constructos contendo cada haplótipo isoladamente, foi observado que a presença do alelo T na região promotora foi a condição mais relevante no direcionamento da atividade transcricional do promotor de *IL8*. Em conclusão, os haplótipos no gene *IL8* mostraram-se funcionais para a regulação da resposta imune frente aos periodontopatógenos e aos estímulos inflamatórios.

Palavras-Chave: Expressão gênica. Polimorfismo genético. Doenças periodontais

Pigossi SC. Influence of haplotypes on *Interleukin 8* gene in cells with immune function [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

Studies by this group investigated polymorphisms in the *Interleukin 8 (IL8)* gene in 500 individuals with and without periodontitis and identified that the ATC/TTC haplotype conferred 2-fold increased susceptibility to periodontal disease (PD) compared to the ATT/TTC haplotype. Clinical studies showed that individuals with *IL8* haplotype associated with PD, even with low microbial challenge, responded in a more exacerbated manner when compared to individuals with not susceptible haplotype. However, the biological functionality of these haplotypes in the *IL8* gene was not investigated by in vitro controlled assays. . The purpose of this study is to evaluate the functionality of haplotypes in the *IL8* gene in immune cells including the investigation of gene reporter expression present in the recombinant plasmids constructed artificially (constructs). Peripheral blood was collected from patients from each haplotype and stimulated with inflammatory mediators and periodontopathogenic bacteria to evaluate the gene expression (mRNA, RT-qPCR), secreted proteins (Multiplex), cellular phenotype profile (flow cytometry), phagocytosis and reactive oxygen species (ROS) by macrophages (flow cytometry) and migration potential of lymphocytes and neutrophils. Constructs containing each haplotype were transfected into Human lymphocytes (JM cells) and expression of the GFP reporter gene was evaluated using flow cytometry. The individuals with the susceptible haplotype (ATC / TTC) had higher levels of IL-8, TNF- α (mRNA and protein), IL-1 β , IL-2R, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES (protein). Significantly greater polarization for the Th1 / M1 phenotype was observed for the susceptible haplotype whereas the non-susceptible haplotype (ATT/TTC) was associated with an attenuated response to periodontopathogens, inclined to the

phenotype. A higher percentage of macrophages producing ROS tend to occur in individuals carrying the susceptible haplotype, as well as increased migration of neutrophils following IL-8 stimulation in these individuals. Regarding the analysis of the haplotypes alone, it was observed that the presence of the T allele in the promoter region is the most relevant condition in directing the transcriptional activity of the *IL8* promoter. In conclusion, the haplotypes in the *IL8* gene were functional for the regulation of immune response to periodontopathogens and to inflammatory stimuli.

Keywords: Gene expression. Genetic polymorphism . Periodontal diseases

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 PROPOSIÇÃO	30
3 PUBLICAÇÕES	31
3.1 Publicação 1	31
3.2 Publicação 2	64
4 DISCUSSÃO GERAL	100
5 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS*	108
APÊNDICE A.....	121
ANEXO A.....	144

1 INTRODUÇÃO

Uma família de citocinas estruturalmente relacionadas com atividade quimiotática para tipos específicos de populações de leucócitos foram identificadas e denominadas como quimiocinas (Birkedal-Hansen⁹, 1993). A marca molecular da família das quimiocinas é a conservação de quatro resíduos de cisteína que afetam a estrutura terciária dessas proteínas. Dependendo do número de aminoácidos que separam dois resíduos de cisteína, as quimiocinas podem ser divididas em subfamílias CXC, CC, C e CX3C. As quimiocinas CXC atraem e ativam principalmente os neutrófilos, enquanto que as quimiocinas CC atraem e ativam monócitos, linfócitos, basófilos, eosinófilos, células natural killer (NK) e células dendríticas (Bazan et al.⁷, 1997).

A Interleucina (IL) 8 é um membro da subfamília CXC com uma ampla gama de efeitos biológicos, incluindo a quimiotaxia e a ativação de neutrófilos (Jiang et al.⁵², 1996). Esses efeitos biológicos da IL-8 são mediados através de sua ligação a dois receptores acoplados à proteína G na superfície celular, denominados CXCR1 e CXCR2 (Holmes et al.⁴⁷, 2009; Murphy et al.⁷³, 2009). Produzida por uma variedade de tipos celulares, incluindo monócitos/macrófagos, queratinócitos e células endoteliais, epiteliais e tumorais (Cromwell et al.²⁰, 1992; Koch et al.⁵⁵, 1991; Kristensen et al.⁵⁶, 1991; Schuerer-Maly et al.⁸⁴, Yasumoto et al.¹⁰⁴), atua em sítios inflamados na atração e ativação de leucócitos polimorfonucleares, induzindo sua migração transendotelial e liberação de enzimas (Carveth et al.¹³, 1989; Schroder⁸³, 1989).

O gene *IL8* está localizado no cromossomo 4 e é constituído de quatro exons. Sua transcrição foi investigada utilizando uma variedade de mutações genéticas e análises de deleção que identificaram uma sequência que abrange os nucleotídeos -1 a -

133 dentro da região flanqueadora 5' do gene como essencial e suficiente para a sua regulação transcricional (Harant et al.⁴⁴, 1996; Mukaida et al.⁷⁰, 1990). Estudos demonstraram que a região promotora do gene *IL8* é predominantemente ativada pela indução do complexo do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) contendo p65, embora a proteína ativadora-1 (AP-1) e a CCAAT/proteína de ligação de intensificador (C/EBP) também possam desempenhar papéis de suporte (Kunsch et al.⁵⁷, 1994; Kunsch et al.⁵⁸, 1993; Mukaida et al.⁷⁰, 1990).

Estímulos incluindo citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) ou a IL-1 (Brasier et al.¹⁰, 1998; Kasahara et al.⁵⁴, 1991), produtos bacterianos (Aihara et al.², 1997; Hobbie et al.⁴⁵, 1997) ou virais (Mastrorarde et al.⁶³, 1998; Murayama et al.⁷¹, 1997) e estresse celular (De Forge et al.²², 1993; Lee et al.⁶¹, 1997) são capazes de induzir rapidamente a produção de IL-8. Notavelmente, alguns estímulos, como IL-1 ou TNF- α , regulam a produção de IL-8 por mais de 100 vezes (Brasier et al.¹⁰, 1998; Kasahara et al.⁵⁴, 1991), enquanto outros, como certas bactérias causam um aumento mais moderado de cinco a doze vezes (Aihara et al.², 1997; Hobbie et al.⁴⁵, 1997).

Apesar da quimiotaxia dos neutrófilos para o local da infecção ser uma etapa crucial na resposta imune induzida por quimioatratadores, condições inflamatórias crônicas geralmente resultam da produção exacerbada de quimiocinas, como a IL-8 (Harada et al.⁴³, 1996). A produção exagerada de IL-8 pode levar a condições inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide (AR) (Brennan et al.¹¹, 1990; Seitz et al.⁸⁵, 1991). A AR é uma doença auto-imune sistêmica e crônica que acomete as articulações múltiplas com etiologia desconhecida associada a incapacidade progressiva, complicações sistêmicas, morte precoce e altos custos socioeconômicos (Alam et al.³, 2017). Entre as citocinas pró-inflamatórias, a IL-1 α/β e TNF- α desencadeiam a via de

sinalização molecular responsável pela patogênese da AR. Essas citocinas recrutam as células da resposta imune inata e adaptativa e promovem a ativação dos sinoviócitos que ativam vários outros mediadores, incluindo a IL-8, resultando em inflamação da membrana sinovial. Na sinovite precoce da AR, a expressão de IL-8 aumentada é observada por sinoviócitos da camada de revestimento (Takahashi et al.⁹⁴, 1999), enquanto que, na doença estabelecida, ambas as células incluindo sinoviócitos e macrófagos demonstram uma expressão significativamente aumentada de IL-8 (Deleuran et al.²⁴, 1994).

Outra condição sistêmica associada a IL-8 é a fibrose cística (FC) caracterizada por uma resposta inflamatória das vias aéreas dominada por neutrófilos (Jundi et al.⁵³, 2015). Um dos principais fatores que contribuem para o grande número de neutrófilos são níveis aumentados de IL-8 que estão presentes no pulmão dos indivíduos com FC. A infecção e a inflamação, juntamente com alterações intrínsecas nas células das vias aéreas da FC, são responsáveis pelos níveis intrapulmonares anormalmente elevados de IL-8 (Jundi et al.⁵³, 2015). Semelhantemente, as citocinas desempenham um papel importante no desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) que se caracteriza pela destruição do parênquima pulmonar com enfisema pulmonar e inflamação das vias aéreas pequenas e centrais (Caramori et al.¹², 2014). A expressão de IL-8 em nível de mRNA e proteína é aumentada 1,5 vezes no epitélio bronquiolar de indivíduos com DPOC em comparação com indivíduos controle e tem sido associada com a severidade da doença (de Boer et al.²¹, 2000; Tomaki et al.⁹⁶, 2007). Há também aumento da expressão de CXCR2, um receptor para IL-8, no epitélio bronquiolar de pacientes com DPOC em comparação com indivíduos controle, sugerindo que este eixo pode ser relevante no recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas pequenas (Gamonal et al.³⁷, 2001).

As citocinas também estão envolvidas na oncogênese, atuando na progressão, invasão e metástase dos tumores através de mecanismos semelhantes aos seus papéis nas funções imunes (Gales et al.³⁸, 2013). Nesse contexto, a IL-8 tem um papel autócrino e/ou parácrino atuando na modulação da sobrevivência e proliferação das células tumorais (Todorovic-Rakovic et al.⁹⁵, 2013). A atividade biológica da IL-8 no microambiente do tumor pode contribuir para sua progressão através da regulação da angiogênese, no crescimento e sobrevivência das células cancerosas, no movimento das células tumorais, na infiltração de leucócitos e na modulação da resposta imune (Yuan et al.¹⁰⁶, 2005). Nesse contexto, níveis elevados de IL-8 foram associados ao desenvolvimento de vários tumores humanos. Ewington et al.²⁸ (2012) encontraram associação entre a IL-8 e a patogênese do carcinoma endometrial. Nastase et al.⁷⁴ (2011) utilizaram os níveis de IL-8 para diagnosticar e acompanhar a progressão de câncer de colón. A IL-8 também foi identificada como o biomarcador urinário mais proeminente para a detecção de câncer de bexiga (Urquidí et al.¹⁰¹, 2012). Além disso, o aumento da IL-8 no soro demonstrou-se ser um indicativo de desenvolvimento de câncer pulmonar clinicamente evidente (Lagiou et al.⁶⁰, 2011). O nível de expressão de IL-8 e seu receptor CXCR-1 nos tecidos tumorais e no soro de pacientes com câncer de pâncreas também foram considerados elevados. Além disso, foi demonstrado que os tecidos tumorais de pacientes com câncer de pâncreas com um nível mais elevado de IL-8 no soro cresceram mais rapidamente e se comportaram de forma mais agressiva do que aqueles com baixos níveis séricos de IL-8 (Chen et al.¹⁶, 2012). As análises de sobrevivência de pacientes com carcinoma nasofaríngeo revelaram que uma maior expressão de IL-8 no tecido tumoral primário era um fator prognóstico independente para sobrevivência global, sobrevida livre de doença e sobrevida livre de metástases (Li et al.⁶², 1997). Miller et al.⁶⁷ (1998) identificou que as células de câncer de mama

expressavam os receptores de IL-8 CXCR-1 e CXCR-2, enquanto que apenas 50% das amostras benignas de tecido mamário expressavam CXCR-1 ou CXCR-2.

A IL-8 também é uma importante quimiocina que participa no estabelecimento e progressão da doença periodontal (DP). As doenças periodontais são doenças inflamatórias infecciosas, causadas por bactérias orais endógenas que colonizam as superfícies dentárias formando biofilmes polimicrobianos (Belibasakis et al.⁸, 2013). A interação do biofilme com os tecidos periodontais desencadeia uma resposta inflamatória, visando prevenir a colonização bacteriana (Feng et al.²⁹, 2006). No entanto, uma resposta inflamatória excessiva resultará na destruição do tecido periodontal, manifestando-se como periodontite e perda dentária, se essa condição não for tratada (Schenkein⁸², 2006). A periodontite é atribuída ao estabelecimento de um biofilme subgingival, constituído por espécies bacterianas específicas, sendo que os microorganismos *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* incluídos no complexo vermelho de Socransky (Socransky et al.⁹¹, 1998) tornam-se prevalente no biofilme subgingival em estágios mais avançados da DP, aumentando conforme a maior profundidade de sondagem e quantidade de sítios com inflamação gengival.

Nesse contexto, a IL-8 é um fator importante na iniciação e manutenção das reações inflamatórias. A IL-8 atrai e ativa os neutrófilos, que são a primeira linha de células imunitárias recrutadas, para sítios infectados. Os neutrófilos são então capazes de migrar através do epitélio juncional do sulco gengival formando uma "parede de leucócitos" entre o biofilme bacteriano e o epitélio gengival (Schenkein⁸², 2006). Assim, a expressão potencial de IL-8 e moléculas de adesão no epitélio juncional foi sugerida para representar um mecanismo regulatório importante que leva à migração de neutrófilos para o sulco gengival (Tonetti⁹⁷, 1997). Todavia, a persistência da resposta

crônica local do hospedeiro pode alterar os papéis protetores das células inflamatórias e ter efeitos deletérios nos tecidos (Graves et al.⁴¹, 2003). A hiperatividade dos neutrófilos está associada à destruição do tecido periodontal (Del Fabbro et al.²³, 2000; Waddington et al.¹⁰², 2000), assim como a produção exacerbada de IL-8 (Harada et al.⁴³, 1996).

Apesar da importância da quimiocina IL-8 no desenvolvimento da DP, uma variedade de estudos mostraram achados contraditórios quanto aos níveis de IL-8 no fluido crevicular gengival (FCG) e na saliva de pacientes com DP. Embora alguns estudos demonstrem níveis mais altos de IL-8 no FCG de pacientes com DP (Gamonal et al.³⁹, 2001; Jacob et al.⁵¹, 2014), outros mostram o resultado oposto (Chung et al.¹⁷, 1997). Baseado nisso, nosso grupo de pesquisa realizou uma revisão sistemática com meta-análise dos estudos disponíveis investigando os níveis IL-8 (mRNA e proteína) no tecido gengival, saliva e FCG em pacientes com DP (Finoti et al.³⁵, 2017). A meta-análise de estudos que utilizaram pg/μl como unidade de medida de IL-8 mostrou que o FCG de pacientes com DP apresentou níveis significativamente mais baixos de IL-8 do que o FCG de indivíduos de controle saudáveis. Zhang et al.¹⁰⁷ (1999) demonstraram que as células do epitélio oral e gengival infectadas com *Porphyromonas gingivalis* produziram IL-8 e, após a infecção, essas células continuaram a expressar *IL8* mRNA, embora o acúmulo da proteína segregada não pudesse ser detectado. Sugeriu-se que a IL-8 poderia ser degradada localmente pelas proteinases produzidas pelas *P. Gingivalis* (Zhang et al.¹⁰⁷, 1999) Dessa forma, esse achado pode explicar os resultados da meta-análise, porém pesquisas adicionais devem confirmar ou negar essa hipótese.

Em relação aos níveis de IL-8 no tecido gengival, os níveis de *IL8* (mRNA e proteína) foram mais elevados em indivíduos com DP em comparação com indivíduos saudáveis (Correa et al.¹⁹, 2012; Duarte et al.²⁶, 2007; Matsuki et al.⁶⁴, 1992; McGee et al.⁶⁵, 1998; Sfakianakis et al.⁸⁷, 2002; Souto et al.⁹², 2014; Tonetti et al.⁹⁸, 1994). A

imuno-histoquímica das amostras de tecido de periodontite mostrou a detecção máxima de IL-8 nas camadas mais profundas do epitélio da bolsa periodontal, estando próxima ao infiltrado inflamatório e associada à infiltração de neutrófilos. Isso confirma o envolvimento de IL-8 na indução e desenvolvimento da periodontite (Tonetti et al.⁹⁸, 1994). Inversamente, níveis mais baixos de IL-8 e número de neutrófilos também foram detectados em espécimes gengivais saudáveis, principalmente no terço coronal do epitélio juncional confirmando o papel desta quimiocina na migração constante de neutrófilos através dos tecidos gengivais e no estabelecimento de equilíbrio entre o desafio bacteriano contínuo e a defesa do hospedeiro (Sfakianakis et al.⁸⁷, 2002; Tonetti et al.⁹⁸, 1994).

Estudos *in vitro* investigando a influência dos microorganismos periodontopatógenos na produção de IL-8 por células epiteliais do tecido gengival (Fujita et al.³⁶, 2010; Huang et al.⁴⁸, 2004; Pahumunto et al.⁷⁶, 2017; Sandros et al.⁷⁹, 2000), células do ligamento periodontal (Sun et al.⁹³, 2010) e por neutrófilos (Kurt-Jones et al.⁵⁹, 2002) também foram realizados. Hung et al.⁴⁸ (2004) demonstrou que a indução da expressão de IL-8 nas células epiteliais gengivais em resposta ao estímulo com *P. gingivalis* ocorre rapidamente após a infecção, sendo acompanhada por uma diminuição nos níveis de IL-8. Essa diminuição pode estar associada à degradação da proteína IL-8 por proteases da *P. gingivalis*. Todavia, a permanência do estímulo bacteriano promove novamente a elevação nos níveis de IL-8. Ademais, esse estudo demonstrou que as vias NF- κ B, MARK p38 e MEK/ERK foram envolvidas na indução da produção de IL-8. Em contraste, a regulação negativa de *IL8* mRNA pela *P. gingivalis* envolveu MEK/ERK, mas não NF- κ B ou MAPK p38.

Sun et al.⁹³ (2010) investigou alterações de expressão dos genes *TLR2* e *TLR4* (Receptores do tipo Toll 2 e 4) e produção de citocinas (IL-1 β , -6, -8, -10 e TNF- α) em

células do ligamento periodontal humano estimuladas com periodontopatógenos inativados pelo calor ou por seus lipopolissacarídeos (LPS) na presença ou ausência de anticorpos monoclonais contra TLR2 ou TLR4 (anti-TLR2/4). Ambos periodontopatógenos e LPS aumentaram a expressão gênica de *TLR2* e *TLR4* e produção de citocinas pelas células do ligamento periodontal. Ademais, esse aumento da expressão pode ser bloqueado na presença de anti-TLR2/4 sugerindo que as bactérias periodontais gram-negativas ou suas LPS podem desempenhar um papel no desencadeamento das respostas mediadas pelos TLR2 e/ou TLR4 e são importantes para as respostas imunes na periodontite.

Pahumunto et al.⁷⁶ (2010) avaliou a expressão de citocinas pelas células epiteliais gengivais estimuladas com extrato de parede celular de subtipos de *Aggregatibacter actinomycetemitans*. Elevados níveis de *IL8* mRNA foram observados após o estímulo com os diferentes subtipos de *A. actinomycetemitans* sendo que o sorotipo f revelou a expressão mais alta em comparação aos outros sorotipos. Todavia, menores níveis de *IL8* mRNA foram observados após estimulação das células com cepas clínicas obtidas de bolsas profundas em comparação com as isoladas de bolsas rasas. Sugeriu-se então que os isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans* que se associam a bolsas profundas podem interferir na função neutrofílica através de níveis mínimos e imunossupressores de IL-8 aumentando sua sobrevivência e virulência. Entretanto, Fujita et al.³⁶ (2010) demonstrou que meio condicionado de células epiteliais gengivais condicionadas com *A. actinomycetemcomitans* aumentam a quimiotaxia de neutrófilos em comparação com células epiteliais gengivais não condicionadas.

A incidência de periodontite também parece estar associada a fatores genéticos sendo que a principal evidência que mostra o envolvimento desses fatores na DP é fornecida por estudos em gêmeos, que estimaram cerca de 50% de herdabilidade mesmo

após ajustes comportamentais (Michalowicz et al.⁶⁶, 2000). Ademais, estudos mostraram que a presença de polimorfismo de base única, ou *single nucleotide polymorphism* (SNP) em genes como a interleucina IL-2, IL-6, IL-10, a metaloproteinase-1 (MMP-1) e o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) 2 estão associados à doença periodontal (Holla et al.⁴⁶, 2006; Scarel-Caminaga et al.⁸¹, 2002; Shimada et al.⁸⁸, 2004; Trevilatto et al.¹⁰⁰, 2003).

Estudos recentes realizados pelo presente grupo de pesquisa investigaram haplótipos formados pelos polimorfismos -251(T/A), +396(T/G) e +781(C/T) no gene *IL8* em 500 indivíduos Brasileiros com e sem DP, revelando que o haplótipo ATC/TTC está 2 vezes mais associado com suscetibilidade à DP ($OddsRatio_{ajustado} = 2,241$; 95% Intervalo de Confiança = 1,104-4,55) (Scarel-Caminaga et al.⁸⁰, 2011). Todos os resultados significativos mantiveram-se após ajustes de variáveis como idade, gênero, cor da pele e hábito de fumar. Em sequência, outro estudo foi desenvolvido por nosso grupo que investigou se o haplótipo ATC/TTC no gene *IL8* associado à suscetibilidade à DP influenciaria a produção da citocina IL-8 (Corbi et al.¹⁸, 2012). No entanto, não foi encontrada diferença nos níveis de IL-8 definida pela carga genética diferencial dos pacientes. Dos mesmos pacientes foi realizada coleta para análise microbiológica nos mesmos sítios da coleta imunológica (Finoti et al.³¹, 2013).

Referente à análise microbiológica, pode-se concluir pelos resultados que há uma associação da suscetibilidade genética à DP conferida pelo haplótipo ATC/TTC no gene *IL-8* com a colonização das bactérias do complexo vermelho nos sítios doentes dos pacientes com periodontite crônica. Indivíduos não suscetíveis à DP (haplótipo AGT/TTC) tiveram maiores níveis de *P.gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* quando comparados com pacientes geneticamente suscetíveis à periodontite crônica. Deve-se salientar que os parâmetros clínicos da DP foram semelhantes entre os grupos de

indivíduos com o haplótipo ATC/TTC que conferia maior suscetibilidade à periodontite crônica, e aqueles que não carregavam o referido haplótipo (Finoti et al.³², 2013; Finoti et al.³⁴, 2013). Sendo assim, mesmo com níveis menores de periodontopatógenos, pacientes com o haplótipo ATC/TTC apresentaram parâmetros clínicos semelhantes aos dos pacientes que não carregavam o haplótipo de suscetibilidade. Desse modo, em relação à DP, fica o questionamento se indivíduos que possuem determinados haplótipos no gene *IL8* responderiam de maneira mais exacerbada a estímulos microbianos semelhantes, induzindo assim maior destruição periodontal mesmo com baixo desafio microbiano.

Para possíveis explicações de diferentes respostas de haplótipos, 14 milhões de SNPs têm sido investigados em associação a doenças e metabolismo diferencial de fármacos (Sachdanandam et al.⁷⁸, 2001). Nos últimos anos, tem-se notado maior tendência em investigar a funcionalidade de SNPs já conhecidos e que já foram associados com diversas doenças, do que buscar novos SNPs. Um estudo realizado por Hull et al.⁴⁹ (2000), identificou o SNP -251(T/A) na região promotora do gene *IL8* relacionado com a suscetibilidade à bronquite e sua associação com a produção da proteína IL-8. Quando presente o alelo A na posição -251, este tende a estar associado com o aumento da produção de IL-8 estimulada por LPS ($p = 0,07$) quando comparado à presença do alelo T na mesma posição. Avaliando a ativação da transcrição de um polimorfismo na posição -845 na região promotora do gene *IL8* em pacientes com doença periodontal, Yamamura et al.⁵⁰ (2012) verificaram que a atividade de transcrição do promotor contendo o alelo T na posição -845 foi aproximadamente 9 vezes mais elevada do que quando continha o alelo C.

Há poucas informações sobre o papel funcional dos polimorfismos e haplótipos nos genes *IL8*, apesar destes serem frequentemente escolhidos em estudos caso-controle

para investigação de associação com as mais diversas patologias (Hull et al.⁴⁹, 2000; Imamura et al.⁵⁰, 2012). Assim, percebe-se que é de grande relevância o preenchimento dessa lacuna no conhecimento da genômica funcional. Nossa hipótese é que tais polimorfismos/haplótipos nos gene *IL8* podem influenciar a produção/expressão de IL-8 e de outros mediadores inflamatórios essenciais na modulação da resposta imune.

5 CONCLUSÕES

- O haplótipo no gene *IL8* associado à DP (ATC/TTC, haplótipo suscetível à DP) apresentou uma polarização significativamente maior para o fenótipo de ativação Th1 / M1 que pode contribuir para a iniciação e manutenção de um estado pró-inflamatório durante periodontite crônica nos indivíduos suscetíveis à periodontite crônica. Por outro lado o haplótipo no gene *IL8* (ATT/TTC) não suscetível à DP foi associado a uma resposta atenuada ao estímulo inflamatório, com uma inclinação para o fenótipo Treg.
- Em relação à análise dos constructos contendo cada haplótipo isoladamente, foi observado que a presença do alelo T na região promotora do gene *IL8* foi a condição mais relevante no direcionamento da atividade transcricional desse gene em células JM estimuladas por periodontopatógenos.
- O haplótipo no gene *IL8* suscetível à DP resultou em maior expressão de IL-8 (mRNA e proteína) pelas células imunes de indivíduos portadores desse haplótipo estimuladas por periodontopatógenos, indicando que essas variações genéticas são funcionais e aumentam a atividade transcricional do gene *IL8* nas células investigadas.
- Níveis mais elevados de mediadores inflamatórios associados à progressão da periodontite, incluindo as citocinas TNF- α (mRNA e proteína), IL-1 β , IL-2R e interferon (IFN) γ (proteína) e quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES foram observados na resposta imune de indivíduos portadores do haplótipo suscetível após estímulos com os periodontopatógenos.

- Maior porcentagem de macrófagos com habilidade de fagocitose foram observados em indivíduos portadores do haplótipo no gene *IL8* não suscetível à DP após estímulos com periodontopatógenos, sugerindo maior capacidade de eliminar o patógeno e promover a efetiva resolução da inflamação em indivíduos não suscetíveis.
- Maior tendência na porcentagem de células produtoras de ROS foi observada em indivíduos portadores do haplótipos suscetível à DP, sugerindo uma indução direta no dano tecidual periodontal nesses pacientes por meio de alta produção de ROS.
- Não houve uma influência significativa dos haplótipos no gene *IL8* na migração de linfócitos e neutrófilos de pacientes portadores dos citados haplótipos.

REFERÊNCIAS*

1. Ahn MH, Park BL, Lee SH, Park SW, Park JS, Kim DJ, et al. A promoter SNP rs4073T>A in the common allele of the interleukin 8 gene is associated with the development of idiopathic pulmonary fibrosis via the IL-8 protein enhancing mode. *Respir Res.* 2011; 12: 73.
2. Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y, et al. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun.* 1997; 65(8): 3218-24.
3. Alam J, Jantan I, Bukhari SNA. Rheumatoid arthritis: recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother.* 2017; 92: 615-33.
4. Ando-Sugimoto ES, da Silva MP, Kawamoto D, Chen C, DiRienzo JM, Mayer MP. The cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits macrophage phagocytosis and subverts cytokine production. *Cytokine.* 2014; 66(1): 46-53.
5. Anovazzi G, Medeiros MC, Pigossi SC, Finoti LS, Souza Moreira TM, Mayer MP, et al. Functionality and opposite roles of two interleukin 4 haplotypes in immune cells. *Genes Immun.* 2017; 18(1): 33-41.
6. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 1994; 55: 97-179.
7. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997; 385(6617): 640-4.
8. Belibasakis GN, Thurnheer T, Bostanci N. Interleukin-8 responses of multi-layer gingival epithelia to subgingival biofilms: role of the "red complex" species. *PLoS One.* 2013; 8(12): e81581.
9. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res.* 1993; 28(6 Pt 2): 500-10.

* 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>

10. Brasier AR, Jamaluddin M, Casola A, Duan W, Shen Q, Garofalo RP. A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF- κ B1, and c-Rel transcription factors. *J Biol Chem*. 1998; 273(6): 3551-61.
11. Brennan FM, Zachariae CO, Chantry D, Larsen CG, Turner M, Maini RN, et al. Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cells. *Eur J Immunol*. 1990; 20(9): 2141-4.
12. Caramori G, Adcock IM, Di Stefano A, Chung KF. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014; 9: 397-412.
13. Carveth HJ, Bohnsack JF, McIntyre TM, Baggiolini M, Prescott SM, Zimmerman GA. Neutrophil activating factor (NAF) induces polymorphonuclear leukocyte adherence to endothelial cells and to subendothelial matrix proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 162(1): 387-93.
14. Chang MC, Tsai YL, Chen YW, Chan CP, Huang CF, Lan WC, et al. Butyrate induces reactive oxygen species production and affects cell cycle progression in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2013; 48(1): 66-73.
15. Chen MT, Dong L, Zhang XH, Yin XL, Ning HM, Shen C, et al. ZFP36L1 promotes monocyte/macrophage differentiation by repressing CDK6. *Sci Rep*. 2015; 5: 16229.
16. Chen Y, Shi M, Yu GZ, Qin XR, Jin G, Chen P, et al. Interleukin-8, a promising predictor for prognosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(10): 1123-9.
17. Chung RM, Grbic JT, Lamster IB. Interleukin-8 and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 1997; 24(3): 146-52.

18. Corbi SC, Anovazzi G, Finoti LS, Kim YJ, Capela MV, Secolin R, et al. Haplotypes of susceptibility to chronic periodontitis in the Interleukin 8 gene do not influence protein level in the gingival crevicular fluid. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(10):1355-61.
19. Correa JD, Madeira MF, Resende RG, Correia-Silva Jde F, Gomez RS, de Souza Dda G, et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and -17F genes and chronic periodontal disease. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 846052.
20. Cromwell O, Hamid Q, Corrigan CJ, Barkans J, Meng Q, Collins PD, et al. Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology.* 1992; 77(3): 330-7.
21. de Boer WI, Sont JK, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken JH, Hiemstra PS. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *J Pathol.* 2000; 190(5): 619-26.
22. DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem.* 1993; 268(34): 25568-76.
23. Del Fabbro M, Francetti L, Pizzoni L, Weinstein RL. Congenital neutrophil defects and periodontal diseases. *Minerva Stomatol.* 2000; 49(6): 293-311.
24. Deleuran B, Lemche P, Kristensen M, Chu CQ, Field M, Jensen J, et al. Localisation of interleukin 8 in the synovial membrane, cartilage-pannus junction and chondrocytes in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1994; 23(1): 2-7.
25. Dennison DK, Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 54-78.

26. Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Parada CA, Casati MZ, Nociti FH, Jr. Overexpression of interleukin-1beta and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Periodontol Res.* 2007; 42(4): 377-81.
27. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11(1): 81-128.
28. Ewington L, Taylor A, Sriraksa R, Horimoto Y, Lam EW, El-Bahrawy MA. The expression of interleukin-8 and interleukin-8 receptors in endometrial carcinoma. *Cytokine.* 2012; 59(2): 417-22.
29. Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000.* 2006; 40: 50-76.
30. Finoti LS. Investigação da funcionalidade de haplótipos no gene interleucina 8 no contexto da periodontite crônica. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015. p148.
31. 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
32. Finoti LS, Corbi SC, Anovazzi G, Teixeira SR, Capela MV, Tanaka MH, et al. Pathogens levels and clinical response to periodontal treatment in patients with Interleukin 8 haplotypes. *Pathog Dis.* 2013; 69(1):21-28.
33. Finoti LS, Corbi SC, Anovazzi G, Teixeira SR, Steffens JP, Secolin R, et al. Association between IL8 haplotypes and pathogen levels in chronic periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32(10): 1333-40.
34. Finoti LS, Corbi SC, Anovazzi G, Teixeira SR, Steffens JP, Secolin R, et al. Association between IL8 haplotypes and pathogen levels in chronic periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32(10):1333-40

35. Finoti LS, Nepomuceno R, Pigossi SC, Corbi SC, Secolin R, Scarel-Caminaga RM. Association between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(22): e6932.
36. Fujita T, Kishimoto A, Shiba H, Hayashida K, Kajiya M, Uchida Y, et al. Irsogladine maleate regulates neutrophil migration and E-cadherin expression in gingival epithelium stimulated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Biochem Pharmacol*. 2010; 79(10): 1496-505.
37. Fuke S, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Morikawa T, Katoh H, Nishimura M. Chemokines in bronchiolar epithelium in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; 31(4): 405-12.
38. Gales D, Clark C, Manne U, Samuel T. The Chemokine CXCL8 in Carcinogenesis and Drug Response. *ISRN Oncol*. 2013; 2013: 859154.
39. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res*. 2001; 36(3): 194-203.
40. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res*. 2010; 89(12): 1349-63.
41. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003; 74(3): 391-401.
42. 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.
43. Harada A, Mukaida N, Matsushima K. Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases. *Mol Med Today*. 1996; 2(11): 482-9.

44. Harant H, de Martin R, Andrew PJ, Foglar E, Dittrich C, Lindley IJ. Synergistic activation of interleukin-8 gene transcription by all-trans-retinoic acid and tumor necrosis factor-alpha involves the transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem.* 1996; 271(43): 26954-61.
45. Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 1997; 159(11): 5550-9.
46. Holla LI, Fassmann A, Muzik J, Vanek J, Vasku A. Functional polymorphisms in the matrix metalloproteinase-9 gene in relation to severity of chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2006; 77(11): 1850-5.
47. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *J Immunol.* 2009; 183(5): 2895-7.
48. Huang GT, Zhang HB, Dang HN, Haake SK. Differential regulation of cytokine genes in gingival epithelial cells challenged by *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog.* 2004; 37(6): 303-12.
49. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax.* 2000; 55(12): 1023-7.
50. Imamura Y, Fujigaki Y, Higaki K, Yoshinari N, Wang PL. A novel single nucleotide polymorphism of the interleukin-8 promoter: Its transcriptional regulation and analysis of the mutation in periodontal disease in the Japanese population. *J Hard Tissue Biol.* 2012; 21(4): 427-33.
51. Jacob PS, Nath S, Patel RP. Evaluation of interleukin-1beta and 8 in gutka chewers with periodontitis among a rural Indian population. *J Periodontal Implant Sci.* 2014; 44(3): 126-33.
52. Jiang Y, Russell TR, Graves DT, Cheng H, Nong SH, Levitz SM. Monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin-8 production in mononuclear cells stimulated by oral microorganisms. *Infect Immun.* 1996; 64(11): 4450-5.

53. Jundi K, Greene CM. Transcription of Interleukin-8: How altered regulation can affect cystic fibrosis lung disease. *Biomolecules*. 2015; 5(3): 1386-98.
54. Kasahara T, Mukaida N, Yamashita K, Yagisawa H, Akahoshi T, Matsushima K. IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. *Immunology*. 1991; 74(1): 60-7.
55. Koch AE, Kunkel SL, Burrows JC, Evanoff HL, Haines GK, Pope RM, et al. Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J Immunol*. 1991; 147(7): 2187-95.
56. Kristensen MS, Paludan K, Larsen CG, Zachariae CO, Deleuran BW, Jensen PK, et al. Quantitative determination of IL-1 alpha-induced IL-8 mRNA levels in cultured human keratinocytes, dermal fibroblasts, endothelial cells, and monocytes. *J Invest Dermatol*. 1991; 97(3): 506-10.
57. Kunsch C, Lang RK, Rosen CA, Shannon MF. Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol*. 1994; 153(1): 153-64.
58. Kunsch C, Rosen CA. NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol*. 1993; 13(10): 6137-46.
59. Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger PE, et al. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood*. 2002; 100(5): 1860-8.
60. Lagiou P, Trichopoulos D. Inflammatory biomarkers and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011; 103(14): 1073-5.
61. Lee LF, Haskill JS, Mukaida N, Matsushima K, Ting JP. Identification of tumor-specific paclitaxel (Taxol)-responsive regulatory elements in the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol*. 1997; 17(9): 5097-105.

62. Li XJ, Peng LX, Shao JY, Lu WH, Zhang JX, Chen S, et al. As an independent unfavorable prognostic factor, IL-8 promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition and activation of AKT signaling. *Carcinogenesis*. 2012; 33(7): 1302-9.
63. Mastronarde JG, Monick MM, Mukaida N, Matsushima K, Hunninghake GW. Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *J Infect Dis*. 1998; 177(5): 1275-81.
64. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology*. 1992; 76(1): 42-7.
65. McGee JM, Tucci MA, Edmundson TP, Serio CL, Johnson RB. The relationship between concentrations of proinflammatory cytokines within gingiva and the adjacent sulcular depth. *J Periodontol*. 1998; 69(8): 865-71.
66. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000; 71(11): 1699-707.
67. Miller LJ, Kurtzman SH, Wang Y, Anderson KH, Lindquist RR, Kreutzer DL. Expression of interleukin-8 receptors on tumor cells and vascular endothelial cells in human breast cancer tissue. *Anticancer Res*. 1998; 18(1A): 77-81.
68. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 1996; 17(3): 138-46.
69. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(12): 958-69.

70. Mukaida N, Mahe Y, Matsushima K. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem.* 1990; 265(34): 21128-33.
71. Murayama T, Ohara Y, Obuchi M, Khabar KS, Higashi H, Mukaida N, et al. Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. *J Virol.* 1997; 71(7): 5692-5.
72. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(12): 933-44.
73. Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science.* 1991. 253(5025): 1280-1283.
74. Nastase A, Paslaru L, Niculescu AM, Ionescu M, Dumitrascu T, Herlea V, et al. Prognostic and predictive potential molecular biomarkers in colon cancer. *Chirurgia (Bucur).* 2011; 106(2): 177-85.
75. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol.* 1991; 9: 617-48.
76. Pahumunto N, Chotjumlong P, Makeudom A, Krisanaprakornkit S, Dahlen G, Teanpaisan R. Pro-inflammatory cytokine responses in human gingival epithelial cells after stimulation with cell wall extract of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* subtypes. *Anaerobe.* 2017; 48: 103-9.
77. Parachuru VP, Coates DE, Milne TJ, Hussaini HM, Rich AM, Seymour GJ. Forkhead box P3-positive regulatory T-cells and interleukin 17-positive T-helper 17 cells in chronic inflammatory periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2014; 49(6): 817-26.
78. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001; 409(6822): 928-33.

79. Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, Madianos PN, Kinane DF, Papapanou PN. Cytokine responses of oral epithelial cells to Porphyromonas gingivalis infection. *J Dent Res.* 2000; 79(10): 1808-14.
80. Scarel-Caminaga RM, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Corbi SC, Sogumo PM, et al. Haplotypes in the interleukin 8 gene and their association with chronic periodontitis susceptibility. *Biochem Genet.* 2011; 49(5-6): 292-302.
81. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SR. Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(7): 587-91.
82. Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2006; 40: 77-93.
83. Schroder JM. The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP/interleukin 8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. *J Exp Med.* 1989; 170(3): 847-63.
84. Schuerer-Maly CC, Eckmann L, Kagnoff MF, Falco MT, Maly FE. Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology.* 1994; 81(1): 85-91.
85. Seitz M, Dewald B, Gerber N, Baggiolini M. Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1991; 87(2): 463-9.
86. Seymour GJ. Importance of the host response in the periodontium. *J Clin Periodontol.* 1991; 18(6): 421-6.
87. Sfakianakis A, Barr CE, Kreutzer DL. Localization of the chemokine interleukin-8 and interleukin-8 receptors in human gingiva and cultured gingival keratinocytes. *J Periodontal Res.* 2002; 37(2): 154-60.
88. Shimada Y, Tai H, Endo M, Kobayashi T, Akazawa K, Yamazaki K. Association of tumor necrosis factor receptor type 2 +587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(6): 463-9.

89. Siveke JT, Hamann A. T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol.* 1998; 160(2): 550-4.
90. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Campylobacter* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res.* 1984; 63(3): 412-21.
91. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(2): 134-44.
92. Souto GR, Queiroz CM, Jr., Costa FO, Mesquita RA. Relationship between chemokines and dendritic cells in human chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2014; 85(10): 1416-23.
93. Sun Y, Shu R, Li CL, Zhang MZ. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. *J Periodontol.* 2010; 81(10): 1488-96.
94. Takahashi Y, Kasahara T, Sawai T, Rikimaru A, Mukaida N, Matsushima K, et al. The participation of IL-8 in the synovial lesions at an early stage of rheumatoid arthritis. *Tohoku J Exp Med.* 1999; 188(1): 75-87.
95. Todorovic-Rakovic N, Milovanovic J. Interleukin-8 in breast cancer progression. *J Interferon Cytokine Res.* 2013; 33(10): 563-70.
96. Tomaki M, Sugiura H, Koarai A, Komaki Y, Akita T, Matsumoto T, et al. Decreased expression of antioxidant enzymes and increased expression of chemokines in COPD lung. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007; 20(5): 596-605.
97. Tonetti MS. Molecular factors associated with compartmentalization of gingival immune responses and transepithelial neutrophil migration. *J Periodontal Res.* 1997; 32(1 Pt 2): 104-9.
98. Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, Mueller C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect Immun.* 1994; 62(9): 4005-14.

99. Trevani AS, Chorny A, Salamone G, Vermeulen M, Gamberale R, Schettini J, et al. Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. *Eur J Immunol.* 2003; 33(11): 3164-74.
100. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, Jr., de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(5): 438-42.
101. Urquidi V, Chang M, Dai Y, Kim J, Wolfson ED, Goodison S, et al. IL-8 as a urinary biomarker for the detection of bladder cancer. *BMC Urol.* 2012; 12:1-12.
102. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis.* 2000; 6(3): 138-51.
103. Wells PG, McCallum GP, Chen CS, Henderson JT, Lee CJ, Perstin J, et al. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol Sci.* 2009; 108(1): 4-18.
104. Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida N, Murakami S, Mai M, Matsushima K. Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J Biol Chem.* 1992; 267(31): 22506-11.
105. Yu JY, Lee SY, Son YO, Shi X, Park SS, Lee JC. Continuous presence of H₂O₂ induces mitochondrial-mediated, MAPK- and caspase-independent growth inhibition and cytotoxicity in human gingival fibroblasts. *Toxicol In Vitro.* 2012; 26(4): 561-70.
106. Yuan A, Chen JJ, Yao PL, Yang PC. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci.* 2005; 10: 853-65.
107. Zhang J, Dong H, Kashket S, Duncan MJ. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. *Microb Pathog.* 1999; 26(5): 275-80.

108. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. [000; 12(2): 121-7.