



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, Maíra 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. Ticiane 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 ***Vlademir*** 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 Th2

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 (Mastronarde 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 quimioatratores, 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 etologia 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 subgengival, 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 subgengival 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-κB, 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-κB 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-1β, -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, Iamamura 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.

2 PROPOSIÇÃO

Proposição geral:

Investigar a influência dos haplótipos ATC/TTC e ATT/TTC presentes no gene *IL8* na resposta de células imunes desafiadas por diferentes estímulos inflamatórios.

Objetivos específicos:

Publicação 1: Functionality of *Interleukin 8* haplotypes in the response of lymphocytes and macrophages to Gram-negative bacteria*

O objetivo deste estudo foi investigar a funcionalidade biológica dos haplótipos no gene *IL8* na resposta imune de linfócitos e monócitos frente a estímulos inflamatórios e microbianos. Para isso, avaliou-se o impacto desses haplótipos no gene *IL-8* na polarização de células imunes, regulação da expressão gênica em níveis de mRNA, fagocitose de macrófagos / produção espécies de oxigênio reativo (ROS) e migração de linfócitos.

Publicação 2: Functional role of the ATC/TTC haplotype in the *Interleukin 8* gene in the response of neutrophils and leukocytes to Gram-negative bacteria

O objetivo desse estudo foi investigar a influência dos haplótipos no gene *IL8* na resposta imune de neutrófilos desafiados por estímulos inflamatórios distintos. Avaliou-se a influência desses haplótipos na resposta imune, avaliando a modulação da expressão gênica, os níveis de proteína e migração celular após os estímulos com bactérias gram negativas e estímulos inflamatórios. Também foi determinada a influência específica de cada haplótipo individual na atividade do promotor do gene *IL8* utilizando plasmídeos construídos artificialmente.

3 PUBLICAÇÕES

3.1 Publicação 1

Functionality of *Interleukin 8* haplotypes in the response of lymphocytes and macrophages to Gram-negative bacteria*

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

* Department of Oral Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, UNESP- São Paulo State University, 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- São Paulo State University, SP, Brazil.

Correspondence: Dr. Raquel M. Scarel-Caminaga. UNESP- São Paulo State University, 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 Inflammation Research

Abstract

Individuals carrying the ATC/TTC haplotype in the interleukin 8 (*IL8*) gene were reported as more susceptible to chronic periodontitis (CP), an infectious disease associated with Gram-negative bacteria. This study investigates the functionality of *IL8* haplotypes in lymphocytes and monocytes in the response to CP-associated Gram-negative bacteria (periodontopathogens). Peripheral blood was collected from 6 subjects carrying each haplotype, and their immune cells were challenged with periodontopathogens or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus ionomycin. The outcomes assessed varied depending on the cell type (lymphocytes or monocyte-derived macrophages), and included: phenotypical polarization, gene expression, phagocytic activity, chemotaxis and production of reactive oxygen species (ROS). Subjects carrying the susceptible haplotype (ATC/TTC) showed increased expression of *IL-8* and *TNF- α* and significantly skewing towards pro-inflammatory Th1/M1 phenotypes. There was an increased percentage of ROS-producing monocyte-derived macrophages from individuals carrying the susceptible haplotype. Cells from individuals presenting the non-susceptible haplotype (ATT/TTC) had an overall attenuated response to periodontopathogens, with a discrete trend towards the Treg phenotype. In conclusion, the investigated haplotypes in the *IL8* gene were functional both in monocyte-derived macrophages and lymphocytes. The haplotype associated with increased susceptibility was associated with greater production of ROS and skewing to pro-inflammatory phenotypes.

Keywords: Gene expression. Interleukin-8. Cytokines. Immune system. Genetics. Functional analysis.

Introduction

The invasion of host tissue by microbes or their products induces a protective host response that involves the coordinated involvement of multiple cell types in order to restore homeostasis [1]. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), including monocytes and lymphocytes, act to eliminate microbial pathogens from the bloodstream and tissues and are a major source of cytokines [2]. Cytokines have a critical role for multiple cellular processes, including cell proliferation, migration, differentiation, matrix production, angiogenesis and the host response aiming at clearing the exogenous agents (including radiation, stress, and infection) and restoring tissue homeostasis [3].

The monocyte-macrophage system is one of the first immune cells mobilized to respond to invading organisms. These cells have a crucial role in innate immunity and also in the initiation of the adaptive immune response [4]. Macrophages are long-lived tissue resident cells, and represent the prototypical antigen-presenting cells, activating T lymphocytes and producing proinflammatory cytokines that have both autocrine and paracrine effects, including chemotaxis and phagocytosis processes [5]. Once activated by microorganisms, macrophages usually polarize into two phenotypes: the M1 phenotype, producing pro-inflammatory cytokines, such as Interleukin-1 (IL-1), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) and Interleukin 12 (IL-12); or the alternative M2 phenotype that induces the regulatory cytokine production including Interleukin 10 (IL-10) [6].

Similarly, cytokines are central to the mechanism by which T cells regulate the immune response, including the chemotaxis, activity and cellular processes of other immune cells. [7, 8]. On the basis of their pattern of cytokine production, CD4 T helper-cells are subdivided into an ever-increasing number of phenotypes. The two initially

recognized subsets, designated T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2), are the classically opposed pro- and anti-inflammatory phenotypes, respectively, associated, with acute conditions and infection (Th1) or with allergy and the response to parasites (Th2) [9]. Thus, in general cellular and pro-inflammatory immune responses are mediated by Th1 cells, whereas Th2 cells are associated with humoral immunity and present anti-inflammatory properties [9, 10]. The balance of Th1/Th2 cells ultimately determines whether the immune response to infectious pathogens will be protective [11]. However, sustained activation of the adaptive immune response, including both Th1 and Th2, cause an overproduction of cytokines that results in degradation of host tissues [12]. In addition to Th1/Th2 cells, the Th17 and T regulatory (Treg) cells are other T-helper phenotypes that have antagonistic roles as effector and suppressive cells, respectively [13-15].

Chronic inflammatory diseases are associated with the sustained and excessive production of pro-inflammatory cytokines. Alternatively, defective production of appropriate anti-inflammatory, pro-resolving cytokines may also be involved in the pathogenesis of chronic inflammatory conditions [16]. Individual differences in the levels of cytokines can be attributed to the polymorphisms in their encoding genes, especially if these polymorphisms are in exons or in the promoter region of the genes [17], as demonstrated for Interleukin 1 (IL-1) [18], Interleukin 10 (IL-10) [19], Interleukin 6 (IL-6) [20], Interleukin 4 (IL-4) [21] and Interleukin 8 (IL-8) [22].

IL-8, a member of the CXC family of chemokines, is a major chemoattractant and activator of neutrophils at sites of acute inflammation and lung injury [23]. Elevated *IL8* expression has been attributed to a number of diseases such as chronic obstructive pulmonary disease [24, 25], hypertension [26], carcinogenesis [27, 28], idiopathic pulmonary fibrosis [29, 30] and chronic periodontitis (CP) [26]. The association

between single nucleotide polymorphism (SNPs) in the *IL8* gene and periodontitis is well documented [31] and the -251(T/A), +396(T/G) and +781(C/T) polymorphisms in the *IL8* gene, forming the ATC/TTC haplotype, were associated with periodontal disease. Presence of ATC/TTC haplotype in the *IL8* gene increases periodontal disease susceptibility by two-fold in comparison with other haplotypes, such as the ATT/TTC, which was not associated with reduced susceptibility to periodontal disease [22].

The investigation of the biological functionality of these haplotypes is central to the understanding of the biological mechanisms associated with the pathogenesis of chronic inflammatory conditions. Assessing the functionality of genetic polymorphisms provides insight into the biological relevance with a perspective of clinical application, not only as a risk indicator/prognostic marker but also as a therapeutic target. In this sense, knowledge about the functionality of genetic polymorphisms may contribute to personalized medicine, as appropriate intervention strategies can focus on the more susceptible individual. In this study we investigate the functionality of two *IL8* gene haplotypes in the response of lymphocytes and monocyte/macrophages to Gram-negative bacteria associated with chronic periodontitis. Specifically, we assessed the influence of two *IL8* gene haplotypes on immune cell phenotypical polarization, cytokine gene expression, macrophage phagocytosis and production of reactive oxygen species (ROS) by macrophages and chemotaxis of lymphocytes.

Material and methods

Subjects

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the School of

Dentistry at Araraquara, UNESP, Brazil (Certificate of Presentation to Ethics Assessment – CAAE 18527813.7.0000.5416). The subjects provided written informed consent to participate in this study. The ATC/TTC (susceptible haplotype) or ATT/TTC (non susceptible haplotype) haplotypes of the *IL8* gene were verified in each individual by DNA sequencing (Apêndice A). Sample size calculation was performed by the DDS Research (Sample Size Calculator, Average, two samples) utilizing *IL4* gene expression values of samples from a pilot study. This calculation determined six subjects of each haplotype would allow the detection of significant differences (using 95% significance level and 80% as the power) of 0.3 units on the averaged values between experimental groups (susceptible X non susceptible) with an estimated variation of 0.6 units [32]. Post-hoc calculations using the data obtained (DDS Research algorithm) indicated 100% statistical power for the analysis of gene expression (n=6 patients each group), 83% statistical power for the analysis of immunophenotype (n=5 patients each group), and 70% power for the phagocytosis assay (n=3 patients each group).

Periodontal clinical examinations were performed on all 12 subjects (6 patients from each investigated haplotype). Exclusion criteria were as follows: history of subgingival periodontal debridement or periodontal surgery in the preceding 6 months; use of antibiotics, anti-inflammatory or corticosteroids in previous 4 months; smoking; history of any systemic disease or condition that influences the immune system (cancer, auto-immune conditions, chronic allergies, cardiovascular, and respiratory diseases, diabetes mellitus, hepatitis), infection with human immunodeficiency virus (HIV); immunosuppressive chemotherapy; or current pregnancy or lactation.

Gram-negative bacteria and stimulation of cells

A frozen stock of *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) strain ATCC 33277 was cultured on plates of Tryptic Soy Agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood, 0.5 mg/mL hemin and 1mg/mL menadione. A frozen stock of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) strain JP2 was cultured on Tryptic Soy Agar containing 0.6% w/v yeast extract. Both cultures were maintained in an anaerobic chamber at 37°C in 85% N₂, 5% CO₂ and 10% H₂ for 2 to 3 days and harvested at the mid-logarithmic phase of growth. To calculate the amount of bacteria for the stimulus we adjusted an OD of 0.5 (*Pg*) and 0.2 (*Aa*) at a wavelength of 495nm, which was determined to correlate to 10⁷ CFU/mL. For the immunophenotyping experiments, bacteria were heat-inactivated at 65°C for 1 hour in a water-bath, and stimulus was performed at a proportion of 100:1 (bacteria:cells) for 72 hours. For the migration and phagocytosis/ROS levels experiments, we used live bacteria at a proportion (bacteria:cells) of 100:1 (migration) for 6 hours and 10:1 (phagocytosis and production of ROS), exposing the macrophages to the bacteria for 2 hours in the phagocytosis assay and for 20 minutes in the ROS production assay.

Immunophenotyping

Approximately 20 mL of peripheral blood from each of 5 patients each haplotype was drawn into a vacutainer blood-collecting tube (Becton, Dickinson and Company) with EDTA/K3. Equal volumes of whole blood containing 1x10⁶ PBMCs and RPMI 1640 supplemented with 20% heat-inactivated FBS were combined and immediately stimulated with *Pg* or *Aa* for 72 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. In the last 4 hours of the experimental period, a protein transport inhibitor (BD GolgiStop™, BD Biosciences) was added and stimulation with PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; 50

ng/ μ L) associated with ionomycin calcium salt (500 ng/ μ L was also added. Non-attached cells were collected by centrifugation (400g, 5 min, RT), counted and adjusted to 1×10^6 cells/mL. These samples were then separated into three aliquots: two aliquots were stained for CD4/PE-Cy7 (BD Biosciences) and the remaining aliquot for CD14/PE-Cy7 (BD Biosciences) using optimized concentrations of the antibodies for 30 minutes in the dark. After the initial staining, cells in all aliquots were permeabilized with saponin-containing buffer (Cytoperm, BD Biosciences) for 15 minutes. One of the CD4-stained aliquots was subsequently stained with IFN- γ -FITC/IL4-PE antibodies and the other CD4-stained aliquot was stained with IL17-PE/FoxP3-AlexaFluor488 antibodies. The CD14-stained aliquots were subsequently stained with IL12-FITC and IL10-PE. Staining for intracellular proteins was performed for 40 minutes in the dark and using recommended buffers and antibody concentrations recommended by the supplier (BD Biosciences). Controls for the adjustment of acquisition conditions were unstained samples and isotype-matched stained samples, prepared simultaneously and using the same protocol. Data was acquired in a flow cytometer (FACSVerse, BD Biosciences) using a 488nm laser for excitation and analyzed using the cytometer's software (BD FACSuite, BD Biosciences).

Gene expression

Twenty mLs of peripheral blood from 12 subjects (6 from each investigated *IL8* gene haplotype) were drawn into a vacutainer blood-collecting tube (Becton Dickinson Co.) with EDTA/K3. Separation of nucleated cells was performed using a double gradient of Histopaque (Sigma Chemical Co.). After initial separation of neutrophils from the PBMCs, monocytes and lymphocytes were further isolated from the mixed PBMC population using negative selection magnetic bead-based sorting (Dynabeads untouched

human monocytes kit; Dynabeads untouched human T cells kit, Invitrogen – ThermoFisher Scientific) following the manufacturer's instructions.

Monocytes and lymphocytes 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, the cell concentration was adjusted to 5×10^5 cells/mL for a 4-hour stimulation (period determined from the pilot study - data not shown) in the following conditions: a) 50 ng/ μ L of PMA (Sigma) in addition to 500 ng/ μ L of ionomycin calcium salt (I) (Sigma), b) 5 ng/ μ L of recombinant human interleukin-1 β (IL-1 β ; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), c) culture medium only (negative control), d) live *Pg* or *Aa* at a proportion (bacteria:cells) of 100:1 resuspended in culture medium.

Total RNA was extracted using an affinity column system that included treatment to eliminate possible genomic DNA contaminants (RNAqueous kit, Ambion Inc.). RNA was quantitated using a microvolume spectrophotometer (NanoView, GE Healthcare), and 300 ng of total RNA were used for cDNA synthesis with random hexamer primers and reverse transcriptase (High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems). Real-time PCR was performed using TaqMan chemistry (TaqMan Fast Advanced Master Mix, Applied Biosystems) and pre-designed and optimized sets of primers and probe (Gene expression assays, Applied Biosystems) for detection of *IL-4* (Hs00174122_m1), *IL-8* (Hs00174103_m1), *IL-12* (Hs01073447_m1), and *TNFA* (Hs01113624_g1). Expression of *GAPDH* (Hs02758991_g1) was used as the endogenous control for normalization of the results. Data was analyzed using the $\Delta(\Delta C_t)$ method with the thermocycler's software (StepOne Plus, Applied Biosystems) and presented as relative changes to unstimulated controls.

Phagocytosis

Monocytes from 3 subjects of each investigated haplotype were plated (2×10^5 cells/well) in 96-well cell culture dishes with RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS at 37 °C in 5% CO₂. Differentiation of monocytes into macrophages was induced with PMA (Sigma Aldrich Co.) at final concentration of 10 nM for 24 hours[33]. Differentiation was verified by the increased expression of CD11b marker and by changes in morphology and attachment to the plastic cell culture substrate (data not shown). After an additional 24 h of culture in RMPI 1640 without PMA, macrophages were stimulated for 2 hours with live *Pg* or *Aa* labeled with 10 μM CFSE (in PBS containing 0.1% BSA) for 10 minutes at 37°C. After blocking non-specific binding with Fc-receptor blocking antibody (Human BD Fc Block™, BD Biosciences), macrophages were stained with CD11b-PE-Cy7 (BD Biosciences) for 30 minutes in the dark using the recommended antibody concentration. Data was acquired in a flow cytometer (FACSVerse, BD Biosciences) using 488nm laser excitation and analyzed using the cytometer's software (BD FACSuite, BD Biosciences). Single-positive events represented non-phagocytised bacteria (CFSE-stained, observed in FL1/FITC channel) or macrophages that did not phagocytised bacteria (PE-Cy7-stained, observed in the FL4/PE-Cy7 channel). Double-stained events (CFSE/FITC-positive and PE-Cy7-positive) were interpreted as phagocytizing macrophages.

Reactive Oxygen Species (ROS) production

PMA-differentiated macrophages were initially loaded with the fluorescent ROS substrate carboxy-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (carboxy-H₂DCFDA) (cat #C400, Molecular Probes, Eugene, OR) for 2 hours at 37°C. Cells were then stimulated with live *Pg* or *Aa* at a proportion (bacteria:cells) of 10:1 for 20 minutes at 37°C.

Intracellular ROS cleaved the substrate and the resulting products emitted fluorescence that was detected in the FL1/FITC channel upon excitation with the 488nm laser. Data was acquired in a flow cytometer (FACSVerse, BD Biosciences) and analyzed using the cytometer's software (BD FACSuite, BD Biosciences). Events that were positive in the FL1/FITC channel were counted as ROS-producing cells.

Lymphocyte chemotaxis

Lymphocyte chemotaxis was assessed using boyden chambers (polycarbonate transwell® inserts with pores of 8.0 µm diameter; Corning Incorporated, USA). Lymphocytes (1×10^6 cells / well) of 3 patients of each investigated haplotype were activated with CD3/CD28 antibodies (Dynabeads Human T-Activator, #11131D, Invitrogen) and submitted to three experimental conditions for 8 hours. In negative control samples, lymphocytes were added to the upper chambers and RPMI 1640 medium supplemented with 1% FBS without antibiotics was added in the lower compartment. In positive control samples, 10 ng/µL of recombinant human RANTES (R&D Systems, Minneapolis, MN) was added to the culture medium in the lower compartment as the chemoattractant. In experimental samples, supernatant from Aa-stimulated neutrophil cultures (PMNs obtained from a single patient presenting the non-susceptibility haplotype of *IL8* gene and stimulated with heat-killed *Aa* in the proportion of 10 bacteria:1 cell for 6 hours) was used as chemoattractant in the lower compartment. Lymphocytes from patients presenting each one of the investigated *IL8* gene haplotypes were added in the upper compartment. Eight hours after seeding the lymphocytes in the upper compartment, the membranes were removed, cells present in the upper side of the membrane (facing the upper compartment) were gently removed with sterile cotton swabs and the membranes were stained with DAPI (1 µg/mL) for 5 minutes at RT. The number of lymphocytes migrating into the lower side of the membrane (facing the lower

chamber) were counted in five 200X magnification fields using an inverted fluorescent microscope (Evos FL, AMG Micro). Cell counting was performed automatically using Image J software, version 1.x [34] by standardizing a threshold for the blue color detection that allowed the detection migrating lymphocytes with nuclei stained by DAPI.

Statistical analysis

To compare the outcomes of interest according to *IL8* haplotype, the normality of the data was analyzed using the D'Agostino-Pearson test. Non-parametric tests were performed (Mann-Whitney) utilizing GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc.). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. For all outcomes, a minimum of three independent experiments were performed in triplicate for each stimulus.

Results

Patients carrying each haplotype, who were divided into the susceptible or non-susceptible haplotypes were compared regarding demographic characteristics and periodontal status, demonstrating no significant differences (Table 1). Of note, all individuals were considered periodontally healthy, since they exhibited less than 5% gingival bleeding and no probing pocket depth [PPD] or attachment loss (CAL) greater than 3 mm.

Phenotype of T helper cells and macrophages

T helper (CD4+) cells from individuals presenting the susceptible *IL8* gene haplotype had increased polarization towards Th1 and Th2 phenotypes after stimulation with PMA+Ionomycin. After stimulation with *Pg*, the skew was towards Th1 phenotype,

whereas cells tended to assume a Th2 phenotype after stimulation with *Aa* (Figure 1B). In addition, albeit without statistical significance, *Pg* stimulation induced a noticeable shift to the Th17 profile in CD4⁺ cells from individuals presenting the susceptible *IL8* gene haplotype (Figure 1F). Interestingly, stimulation with PMA+ionomycin induced a greater number of Treg cells in CD4⁺ cells from individuals presenting the non-susceptible *IL8* gene haplotype, suggesting an overall higher anti-inflammatory or immunosuppressive response in subjects carrying the non-susceptible haplotype. Macrophages (CD14⁺ cells) from individuals presenting the susceptible haplotype showed significantly greater polarization towards the M1 phenotype after stimulation with *Pg* (Figure 1D).

Cytokine gene expression by monocytes and lymphocytes

The expression levels of *IL-4*, *IL-8*, *IL-12* and *TNF- α* by monocytes and lymphocytes are shown in Figure 2. In spite of the lack of statistical significance, stimulation of cells from individuals presenting the susceptibility haplotype of *IL8* gene with *Aa* and *Pg* induced a noticeable increased expression of *IL-8*, *IL-12* and *TNF- α* (Figure 2A). *IL-4* gene expression is not shown in figure 2A because cells from individuals presenting the non-susceptible *IL8* gene haplotype did not express detectable levels of this gene, precluding the comparison with the expression levels in cells from individuals presenting the susceptible haplotype. Among the selected candidate cytokine genes assessed, *IL-8* and *TNF- α* were the most prominently expressed by monocytes after *Pg* and *Aa* stimuli. In agreement, *Pg* and *Aa* induced higher *IL-8* and *TNF- α* mRNA levels in lymphocytes from individuals presenting the susceptible haplotype in comparison with lymphocytes from individuals presenting the non-susceptible *IL8* gene haplotype (Figure 2B). Interestingly, lymphocytes from individuals presenting the non-susceptible haplotype showed higher *IL-12* mRNA levels after stimulation with *Aa* in comparison

to lymphocytes from individuals presenting the susceptible haplotype (Figure 2B). Among the investigated genes, upon stimulation with either *Aa* or *Pg*, *IL-8* mRNA was the most prominently expressed gene in lymphocytes from individuals presenting the susceptible *IL8* gene haplotype in comparison with lymphocytes from individuals presenting the non-susceptible haplotype (Figure 2B).

Phagocytosis and production of ROS by macrophages

There is a noticeable trend towards increased phagocytic activity in macrophages from individuals presenting the non-susceptible haplotype (Figure 3). Moreover, a higher phagocytic activity was detected after the stimulus with *Aa* in comparison to *Pg* (Figure 3C and 3D). On the other hand, production of ROS was markedly higher in *Pg*-stimulated macrophages from individuals presenting the susceptible haplotype. Interestingly, using *Aa* as a stimulus to induce oxidative stress in macrophages revealed no difference in the production of ROS according to the two investigated *IL8* gene haplotypes (Figure 4).

Lymphocyte chemotaxis

In the absence of any stimulation (negative control samples), there is a slight increase in the number of migrating lymphocytes from individuals presenting the non-susceptible *IL8* gene haplotype. However, upon the presence of a chemotactic stimulus (RANTES or activated PMN cell culture supernatants), there was no influence of the *IL8* gene haplotypes on lymphocyte chemotaxis (Figure 5).

DISCUSSION

We investigated, for the first time, the functional role of two *IL8* gene haplotypes that our research group previously associated with susceptibility to chronic periodontitis

[22]. We chose to assess the influence of these *IL8* gene haplotypes on the response of lymphocytes and monocytes challenged by *Aa* and *Pg* periodontopathogens, or by the PMA+ionomycin, a potent, polyclonal and nonspecific inflammatory stimulus [32]. Primary monocytes and lymphocytes isolated from peripheral blood of different, systemically and periodontally healthy individuals presenting either of the two investigated *IL8* gene haplotypes were used because of their crucial role in innate and adaptive immunity. In addition, Gram-negative bacteria that are strongly associated with chronic periodontitis (*Pg* and *Aa*) were used as stimuli due to their etiological role in initiating and maintaining the chronic inflammation that is the hallmark of destructive periodontal disease [35].

Presence of the susceptible *IL8* gene haplotype was associated with a skew towards Th1 and M1 phenotypes after stimulation with PMA+ionomycin. Interestingly, stimulation with *Pg* also skewed the phenotype of cells from individuals with the susceptible haplotype towards the Th1/M1 phenotypes. The increased polarization of macrophages towards the M1 phenotype observed in cells from individuals presenting the susceptible *IL8* gene haplotype is related with increased production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1, TNF- α and IL-12, which in turn, drives the response of T helper lymphocytes towards the Th1 phenotype. Conversely, the alternatively-activated macrophages (M2 phenotype) induce the production of regulatory cytokines, such as IL-10, and lead to a Th2 CD4⁺ cell phenotype [6]. It is possible to note, in spite of the lack of statistical significance, that macrophages from individuals presenting the non-susceptible *IL8* gene haplotype showed a clear trend to polarize towards the M2 phenotype after stimulation with *Pg* (Figure 1D). These results suggest that, since individuals carrying the susceptible *IL8* gene haplotype had increased polarization of macrophages towards the M1 phenotype, this may favor the

initiation and maintenance of a pro-inflammatory state during chronic periodontitis in which exposure to *Pg* is sustained. Moreover, the most striking result of phenotypical change was the polarization towards the Th1 phenotype in CD4⁺ cells from individuals presenting the susceptible *IL8* gene haplotype by both ‘generic’ inflammatory and *Pg* periodontopathogen stimuli. In contrast, when stimulated with Aa lymphocytes from individuals presenting the susceptible haplotype were skewed towards the Th2 phenotype, which suggests that differential effects of these distinct bacterial species. Furthermore, stimulation with *Pg* also increased polarization of lymphocytes from individuals presenting the susceptible haplotype towards Th17 phenotype. Collectively, these results suggest that exposure of lymphocytes and monocytes from individuals presenting the susceptible haplotype on the *IL8* gene to *Pg* is associated with a shift towards a pro-inflammatory response, which may be related with the increased periodontal tissue destruction that is the hallmark of phenotype of increased susceptibility to chronic periodontitis.

Interestingly, lymphocytes from individuals presenting the non-susceptible haplotype on the *IL8* gene showed higher polarization toward the regulatory (Treg) phenotype after stimulation with PMA+ionomycin. This observation reinforces the role of the susceptible haplotype on the *IL8* gene in shifting the lymphocyte response towards pro-inflammatory phenotypes. Since Treg cells are indispensable for the maintenance of dominant self-tolerance and immune homeostasis [36], the skew towards the Treg phenotype in lymphocytes from individual presenting the non-susceptible haplotype on the *IL8* gene could be associated with an attenuated response [13] to infectious/inflammatory stimuli; preventing immunologic injury caused by excessive and sustained inflammatory responses in the gingival tissues.

In agreement with the phenotypical pro-inflammatory polarization of lymphocytes and monocytes from individuals carrying the susceptible *IL8* gene haplotype, lymphocytes also presented an increased expression of pro-inflammatory genes in comparison with the lymphocytes from individuals carrying the non-susceptible *IL8* gene haplotype. In addition to increased expression of *IL-8*, *TNF- α* was also up-regulated in cells from individuals carrying the susceptible *IL8* gene haplotype upon stimulation with the Gram-negative periodontopathogens (Figure 2B). *TNF- α* is a potent inflammatory cytokine that up-regulates the production of collagenases, prostaglandin (*PGE*₂), chemokines, cell adhesion molecules and bone resorption-related factors [37, 38]. *TNF- α* is present at high levels in diseased periodontal tissues stimulating the degradation of the connective tissue matrix and bone resorption directly and indirectly [39-41]. *IL-8* secretion leads to activation and migration of neutrophils from the peripheral blood to sites of infection where they exert their role in the clearance of pathogens [42, 43], but also compound on the local production of pro-inflammatory cytokines; which is elevated in the chronic periodontitis [44]. Therefore, the increased expression of these mediators by bacterial-stimulated leukocytes from individuals carrying the *IL8* gene susceptible haplotype may imply in more pronounced inflammation and greater severity of periodontitis.

Increased expression of *IL-12* was observed in monocytes from individuals carrying the susceptible *IL8* gene haplotype after stimulation with both periodontopathogens (Figure 2A), which is in line with a more pronounced inflammation in M1 macrophages from individuals presenting this haplotype (Figure 1D). In contrast, expression of *IL-12* by *Aa*-stimulated monocytes from individuals carrying the susceptible *IL8* gene haplotype was significantly lower in comparison with that of monocytes from individuals presenting the non-susceptible haplotype. It is

possible that increased expression of TNF- α inhibited *IL12* gene expression by *Aa*-stimulated macrophages as part of negative feedback and self-limiting mechanisms controlling cytokine gene expression [45].

In infectious conditions, such as periodontal disease, phagocytosis, production of nitric oxide (NO) and oxidative burst with the production of reactive oxygen species (ROS) are important in the removal and killing of pathogens [46]. Macrophages from individuals carrying the non-susceptible *IL8* gene haplotype had more pronounced phagocytosis of both *Aa* and *Pg*, suggesting a greater ability to eliminate the pathogen and promote the effective resolution of inflammation in the individuals carrying the non-susceptible *IL8* gene haplotype. It is tempting to speculate that a reduced capacity of the host in eliminating infectious organisms in the individuals presenting the susceptible *IL8* gene haplotype results in a chronic and sustained inflammation, which could lead to the more severe tissue destruction observed in these patients carrying this haplotype [45]. However, the results observed should be carefully considered, since the methodology used in this study did not allow for distinction between bacteria that have been actively phagocytosed from those that may have invaded the cytosol, or even the possibility that bacteria in the cytosol prevented maturation and acidification of the phagosome [47].

Production of ROS induced by exposure to *Pg* was markedly increased in macrophages from individuals carrying the *IL8* gene susceptible haplotype. Excessive production of ROS may have cytotoxic effects [48], cause oxidative damage to proteins and DNA [49], interfere with cell growth and cell cycle progression [50], and induce apoptosis [51] of gingival fibroblasts. Therefore, the higher percentage of ROS-producing macrophages from individuals carrying the susceptible haplotype might

suggest a direct induction of periodontal tissue damage in these patients due to an overt oxidative stress response.

Lymphocyte chemotaxis was no different in the two *IL8* gene haplotypes investigated. Interestingly, this lack of influence of *IL8* gene haplotypes was observed in the chemotaxis of lymphocytes to RANTES and also to conditioned culture medium of bacteria-stimulated PMNs from patients presenting the non-susceptible haplotype. We could not obtain additional blood samples from any of the individuals carrying the susceptible *IL8* gene haplotype, which is a limitation in this particular assay.

The main limitation of this study is the limited number of subjects presenting each of the *IL8* genes haplotypes, as this may be the cause of the lack of statistical significance in some experiments. It is important to consider that individual variability among human subjects, even systemically healthy subjects, is considerable. We used an in vitro approach in which we assessed the response of only two types of immune cells, lymphocytes and monocytes/macrophages; independently of the participation of other professional immune cells (dendritic cells, polymorphonuclear neutrophils, NK cells) and of stromal cells (epithelial cells, fibroblasts, endothelial cells) that also play an important role in the host response in vivo. Moreover, the lack of a complex bacterial biofilm prevents the faithful reproduction of cellular responses observed in periodontal disease.

Another aspect to be weighted in the interpretation of the present results is the absence of information regarding other variant regions in the same *IL8* gene and other genes relevant to the immune response, because here we categorized each group according the carriage of the mentioned *IL8* haplotypes, but in reality we might have the potential influence of a myriad of genetic variations in the genome of each patient [52].

Although this is definitively a limitation of the present study, the results suggest an intrinsic difference between the two *IL8* gene haplotypes in the response of lymphocytes and monocytes/macrophages to Gram-negative bacterial species associated with destructive periodontitis. In a recent study, our research group employed a different experimental strategy to investigate the functionality of the same *IL8* haplotypes. Benakanakere et. al. (2016)[43] utilized for the first time the CRISPR/Cas9 system to engineer only the region that spans the three polymorphisms in the *IL8* gene, which were transfected into HEK293T cells. When these cells were stimulated with Poly I:C (a TLR-3 agonist) [53]), the ATC/TTC *IL8* susceptible haplotype significantly up-regulated the *IL8* at both transcriptional and translational levels, and also significantly increased the transmigration of neutrophils [43]. Interestingly, in spite of the methodological differences between the study by Benakanakere et. al. (2016) and the present study, it was possible to confirm that subjects carrying the ATC/TCC haplotype (associated with with increased susceptibility to chronic periodontitis) show higher *IL-8* mRNA expression. In the present study we assessed the response of primary lymphocytes and monocytes/macrophages from individuals presenting the two distinct *IL8* gene haplotypes and observed that the susceptible haplotype was associated with a skew to pro-inflammatory phenotypes, increased expression of pro-inflammatory cytokines, reduced phagocytic activity and increased production of ROS. These results indicate the relevance of the *IL8* gene haplotype associated with increased susceptibility to chronic periodontitis, which may be useful for diverse diseases and conditions associated with infectious organisms and chronic inflammation.

Acknowledgments

This study was supported by State of São Paulo Foundation Research (FAPESP) grant #2013/17887-8 and #2014/04638-2 and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant #141787/2014-7.

References

1. 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. *Infection and immunity* 1996; 64:4450-5.
2. Hanazawa S, Kawata Y, Takeshita A, Kumada H, Okithu M, Tanaka S, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in adult periodontal disease: increased monocyte chemotactic activity in crevicular fluids and induction of MCP-1 expression in gingival tissues. *Infection and immunity* 1993; 61:5219-24.
3. Khabar KS. The AU-rich transcriptome: more than interferons and cytokines, and its role in disease. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2005; 25:1-10.
4. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010; 327:656-61.
5. Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Current opinion in immunology* 1997; 9:17-23.
6. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology* 2008; 8:958-69.
7. Gemmell E, Kjeldsen M, Yamazaki K, Nakajima, Aldred MJ, Seymour. Cytokine profiles of Porphyromonas gingivalis-reactive T lymphocyte line and clones derived from P. gingivalis-infected subjects. *Oral diseases* 1995; 1:139-46.
8. Swain SL. Lymphokines and the immune response: the central role of interleukin-2. *Current opinion in immunology* 1991; 3:304-10.

9. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nature reviews Immunology* 2002; 2:933-44.
10. Jankovic D, Liu Z, Gause WC. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends in immunology* 2001; 22:450-7.
11. Abiko Y, Nishimura M, Kaku T. Defensins in saliva and the salivary glands. *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan* 2003; 36:247-52.
12. Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology* 2000 2007; 43:41-55.
13. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research* 2010; 89:1349-63.
14. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2008; 73:975-83.
15. Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nature reviews Immunology* 2009; 9:883-9.
16. Wang D, Sadee W. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). *The AAPS journal* 2006; 8:E515-20.
17. 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. *Archives of oral biology* 2012; 57:1355-61.
18. Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *Journal of dental research* 2000; 79:1864-9.
19. Crawley E, Woo P, Isenberg DA. 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 and rheumatism* 1999; 42:2017-8.

20. Smith AJ, D'Aiuto F, Palmen J, Cooper JA, Samuel J, Thompson S, et al. Association of serum interleukin-6 concentration with a functional IL6 - 6331T>C polymorphism. *Clinical chemistry* 2008; 54:841-50.
21. Gonzales JR, Groger S, Haley G, Bodeker RH, Meyle J. The interleukin-4 - 34TT and -590TT genotype is correlated with increased expression and protein production in aggressive periodontitis. *Molecular immunology* 2010; 47:701-5.
22. 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. *Biochemical genetics* 2011; 49:292-302.
23. Aggarwal A, Baker CS, Evans TW, Haslam PL. G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome. *The European respiratory journal* 2000; 15:895-901.
24. Gilowska I. [CXCL8 (interleukin 8)--the key inflammatory mediator in chronic obstructive pulmonary disease?]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2014; 68:842-50.
25. Caramori G, Adcock IM, Di Stefano A, Chung KF. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 2014; 9:397-412.
26. Martynowicz H, Janus A, Nowacki D, Mazur G. The role of chemokines in hypertension. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University* 2014; 23:319-25.
27. Gales D, Clark C, Manne U, Samuel T. The Chemokine CXCL8 in Carcinogenesis and Drug Response. *ISRN oncology* 2013; 2013:859154.
28. Felipe AV, Silva TD, Pimenta CA, Kassab P, Forones NM. Interleukin-8 gene polymorphism and susceptibility to gastric cancer in a Brazilian population. *Biological research* 2012; 45:369-74.
29. Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *International journal of hematology* 2000; 72:391-8.
30. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2003; 284:L566-77.
31. Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 2003; 14:430-49.

32. 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 and immunity* 2017; 18:33-41.
33. Chen MT, Dong L, Zhang XH, Yin XL, Ning HM, Shen C, et al. ZFP36L1 promotes monocyte/macrophage differentiation by repressing CDK6. *Scientific reports* 2015; 5:16229.
34. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 2012; 9:671-5.
35. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *Journal of dental research* 1984; 63:412-21.
36. Downs-Canner S, Berkey S, Delgoffe GM, Edwards RP, Curiel T, Odunsi K, et al. Suppressive IL-17A⁺Foxp3⁺ and ex-Th17 IL-17A^{neg}Foxp3⁺ Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. *Nature communications* 2017; 8:14649.
37. Wajant H, Pfeffer K, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factors in 1998. *Cytokine & growth factor reviews* 1998; 9:297-302.
38. Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, et al. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *The Keio journal of medicine* 2005; 54:127-31.
39. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology* 2008; 79:1585-91.
40. Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM. Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *The Journal of clinical investigation* 2003; 111:821-31.
41. Garlet GP, Martins W, Jr., Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 2004; 31:671-9.
42. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *The Journal of clinical investigation* 1989; 84:1045-9.
43. Benakanakere MR, Finoti LS, Tanaka U, Grant GR, Scarel-Caminaga RM, Kinane DF. Investigation of the functional role of human Interleukin-8 gene

- haplotypes by CRISPR/Cas9 mediated genome editing. *Scientific reports* 2016; 6:31180.
44. Kinane DF, Galicia JC, Gorr SU, Stathopoulou PG, Benakanakere M. P. gingivalis interactions with epithelial cells. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2008; 13:966-84.
 45. Ando-Suguimoto 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; 66:46-53.
 46. Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *Journal of leukocyte biology* 1996; 59:505-11.
 47. Lenzo JC, O'Brien-Simpson NM, Cecil J, Holden JA, Reynolds EC. Determination of Active Phagocytosis of Unopsonized *Porphyromonas gingivalis* by Macrophages and Neutrophils Using the pH-Sensitive Fluorescent Dye pHrodo. *Infection and immunity* 2016; 84:1753-60.
 48. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* 1991; 11:81-128.
 49. 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. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2009; 108:4-18.
 50. 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. *Journal of periodontal research* 2013; 48:66-73.
 51. 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. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2012; 26:561-70.
 52. Anovazzi G, Medeiros MC, Pigossi SC, Finoti LS, Mayer MP, Rossa CJ, et al. Functional Haplotypes in Interleukin 4 Gene Associated with Periodontitis. *PloS one* 2017; 12:e0169870.

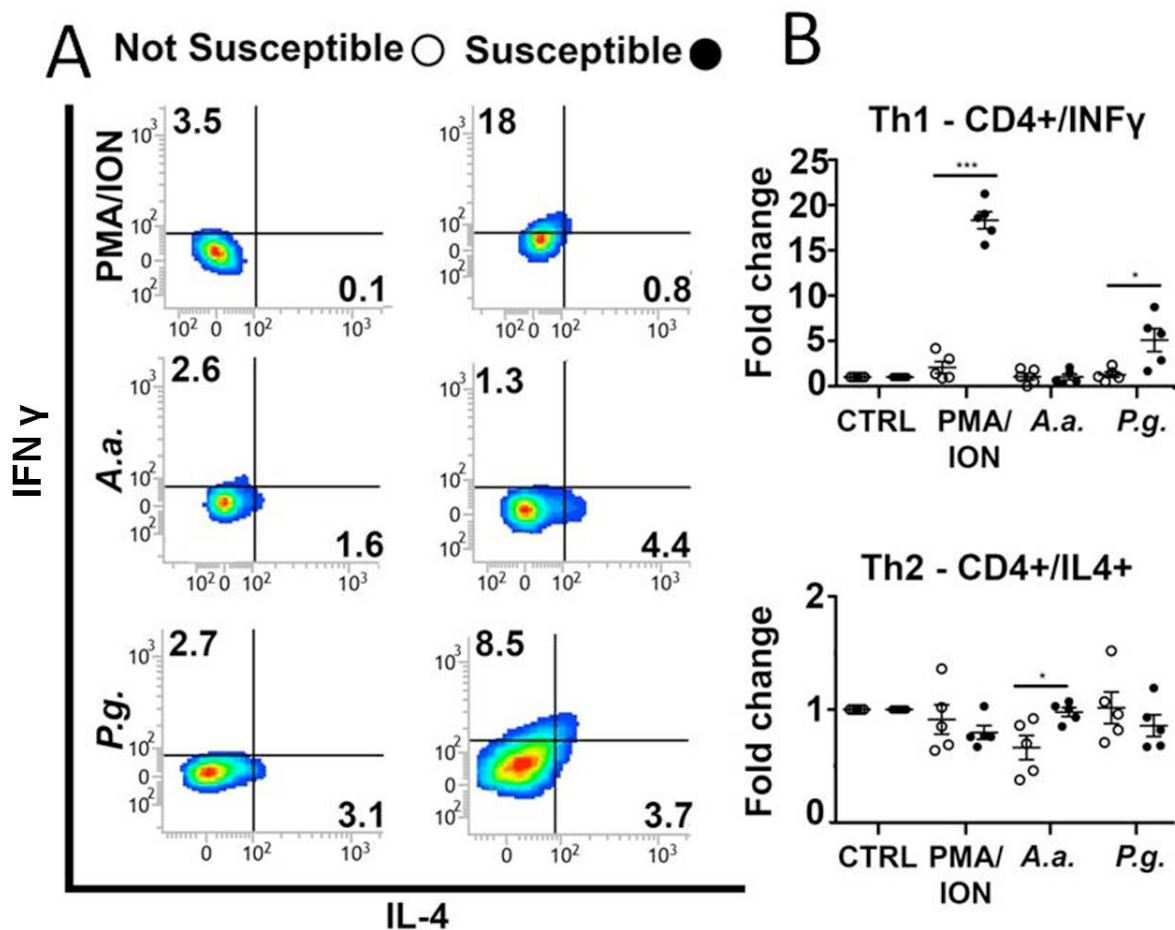
53. Antoniak S, Mackman N. Multiple roles of the coagulation protease cascade during virus infection. *Blood* 2014; 123:2605-13.

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

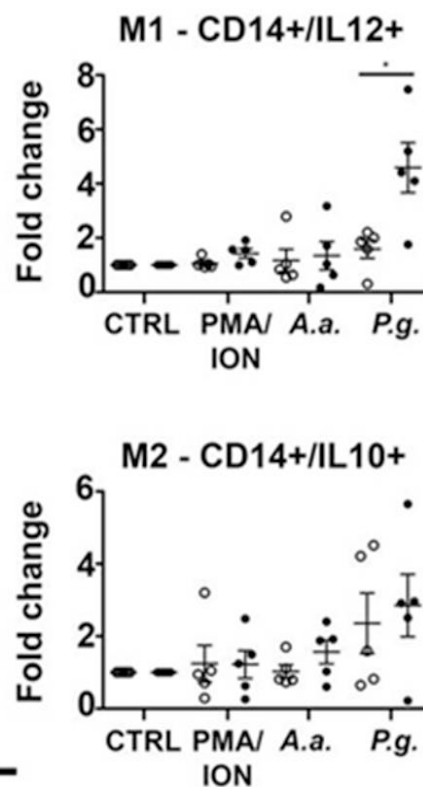
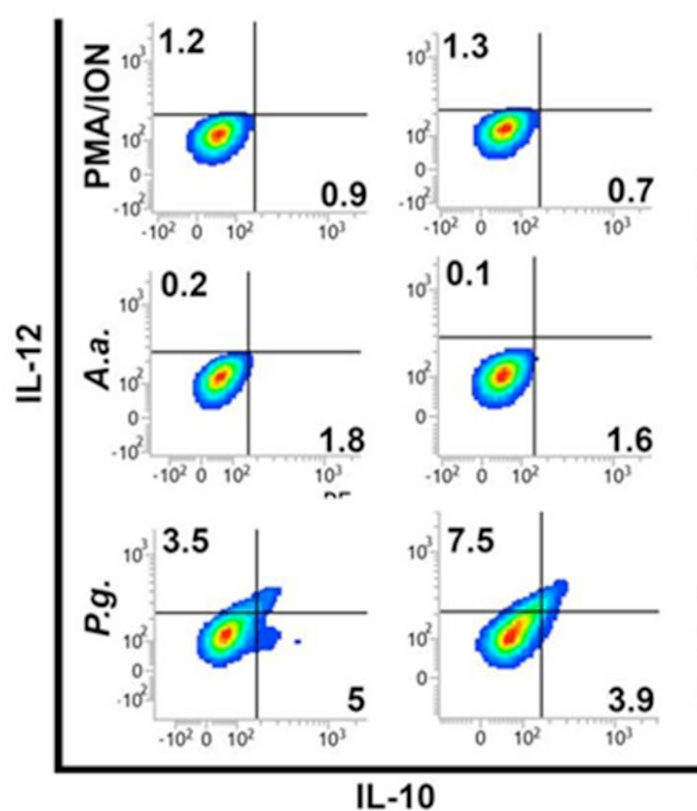
Haplotypes/Characteristics	Susceptible (n=6)	Not Susceptible (n=6)	<i>p</i>
Median Age (min-max)	56.33 ($\pm$ 3.5)	50.00 $\pm$ (4.6)	0,3050
Gender (%)			
Female	3 (50.0)	4 (90.0)	1,00
Male	3 (50.0)	2 (10.0)	
N° of teeth (median(min-max))	23.00 ($\pm$ 1.9)	24.83 ($\pm$ 1.5)	0,4748
BoP (%; median(min-max))	25.93 ($\pm$ 8.6)	19.83 ($\pm$ 9.1)	0,6375
PPD (mm; (median(min-max)))	1.912 ($\pm$ 0.12)	1.968 $\pm$ (0.17)	0,7945
CAL (mm; (median(min-max)))	2.433 $\pm$ (0.27)	2.288 ($\pm$ 0.22)	0,6903
n = individuals number; % = percentage of the number of individuals; BOP = Bleeding on Probing; PPD = Periodontal Probing Depth; CAL = Clinical Attachment Level			

Figures

Figure 1: Cell phenotypic profile by flow cytometry from whole blood of individuals with the with the ATC/TTC IL4 (susceptible) or ATT/TTC (Not susceptible) haplotype after after PMA+I stimulus, *Aa* or *Pg* stimuli (a, c, e) dot-blot representative of cells; (b)Th1 and Th2 lymphocytes; (d) M1 and M2 monocytes; (f) Th17 and Treg lymphocytes. (b, d, f) fold change calculated in comparison to the percentage of positively stained cells of the ATC/TTC haplotype in control/unstimulated conditions. * $p \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$.



C Not Susceptible ○ Susceptible ● D



E Not Susceptible ○ Susceptible ● F

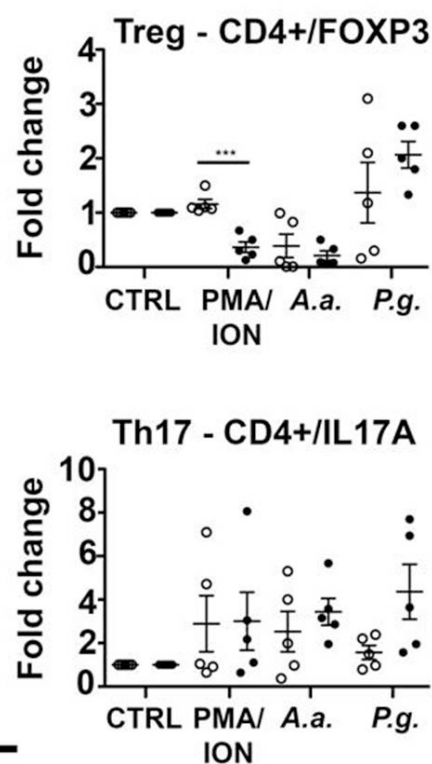
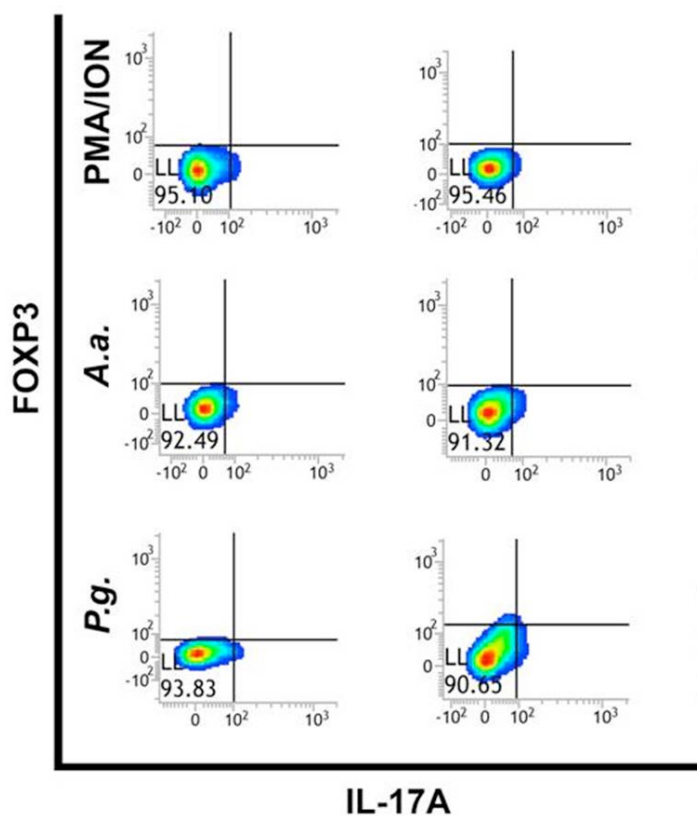
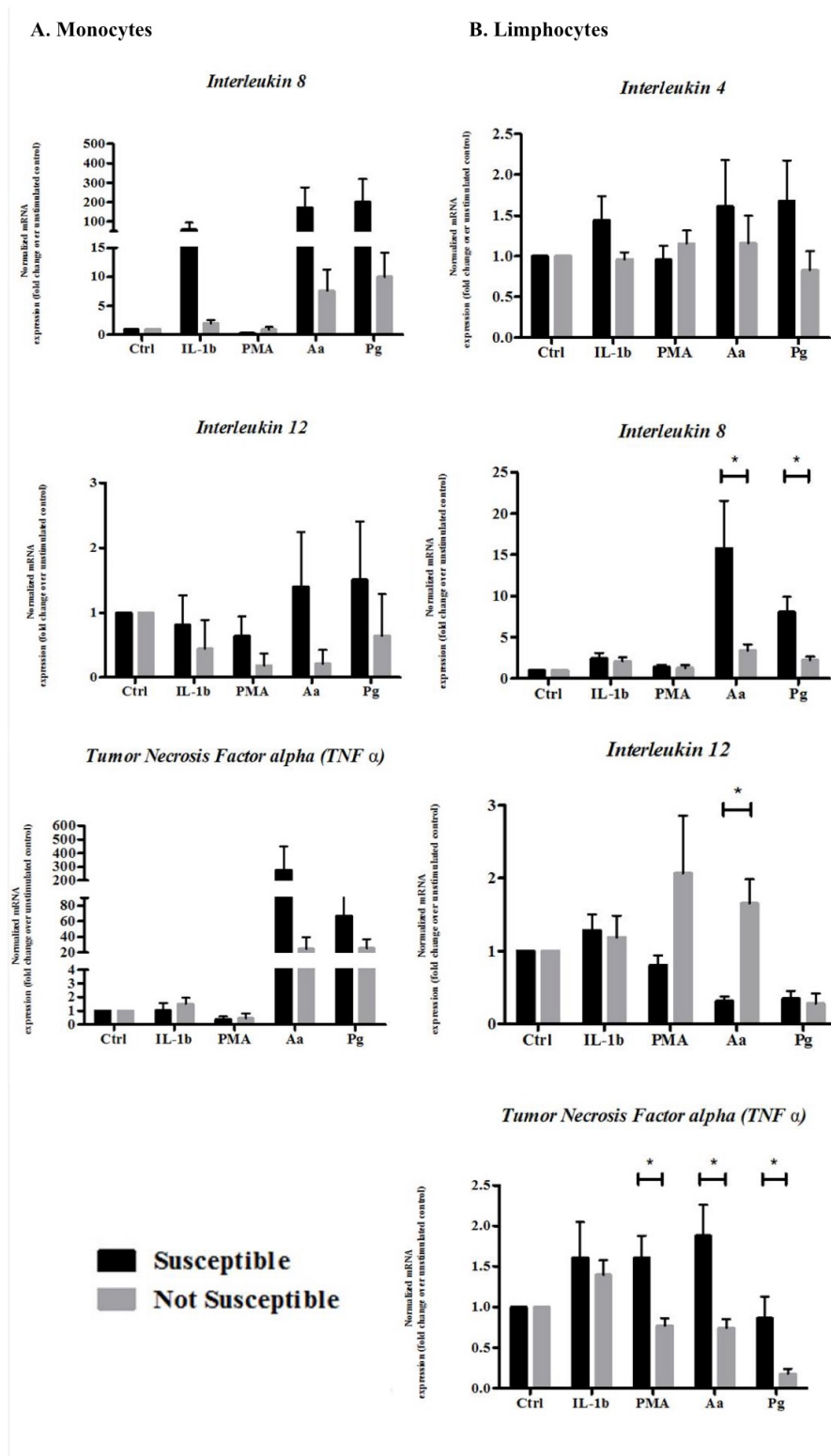


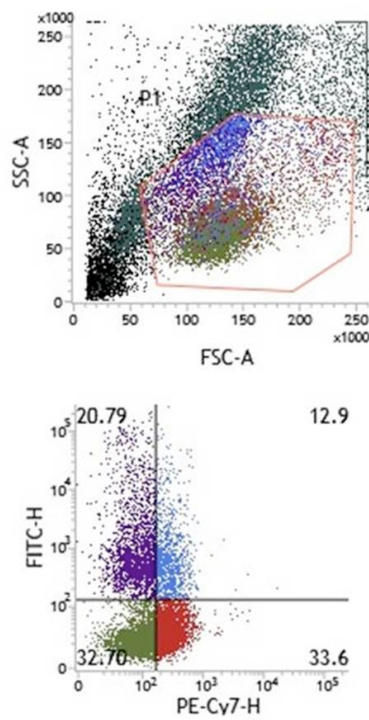
Figure 2: Gene expression of *IL4*, *IL8*, *IL12* and *TNF α* assessed in isolated cells from peripheral blood of individuals with the ATC/TTC *IL4* (susceptible) or ATT/TTC (Not susceptible) haplotype after PMA+I, *IL-1 β* , *Aa* or *Pg* stimuli. The mRNA levels



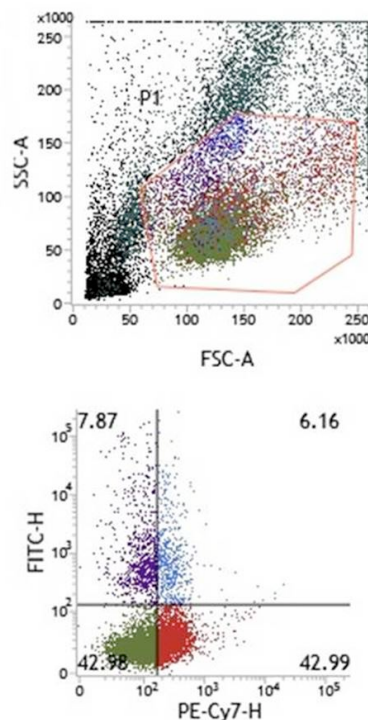
(normalized by GAPDH) are represented in fold change in: (a) monocytes; and (b) lymphocytes. Mean values of the relative gene quantifications of the susceptible and not susceptible groups are represented in columns, and bars show standard deviations. $*p \leq 0.05$.

Figure 3: Percentage of phagocytosing cells assessed in macrophage cells from peripheral blood of individuals with the ATC/TTC IL4 (susceptible) or ATT/TTC (Not susceptible) haplotype after *Aa* or *Pg* stimuli. (a) dot-blot representative of cells of not susceptible haplotype after *Aa* stimuli; (b) dot-blot representative of cells of susceptible haplotype after *Aa* stimuli; (c) *Aa* stimuli; (d) *Pg* stimuli.

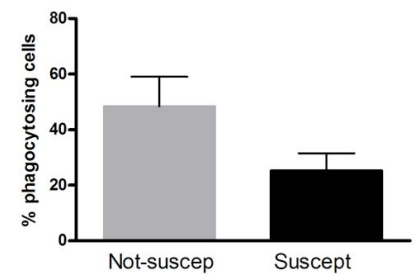
A. Not Susceptible



B. Susceptible



C. *Aa*



D. *Pg*

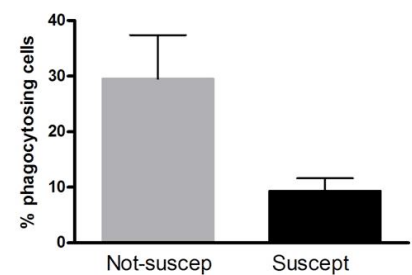


Figure 4: Percentage of ROS-producing cells assessed in macrophage cells from peripheral blood of individuals with the ATC/TTC IL4 (susceptible) or ATT/TTC (Not susceptible) haplotype after *Aa* or *Pg* stimuli. (a) dot-blot representative of cells of not susceptible and susceptible haplotype after *Aa* or *Pg* stimuli. (b) *Pg* stimuli; (c) *Aa* stimuli.

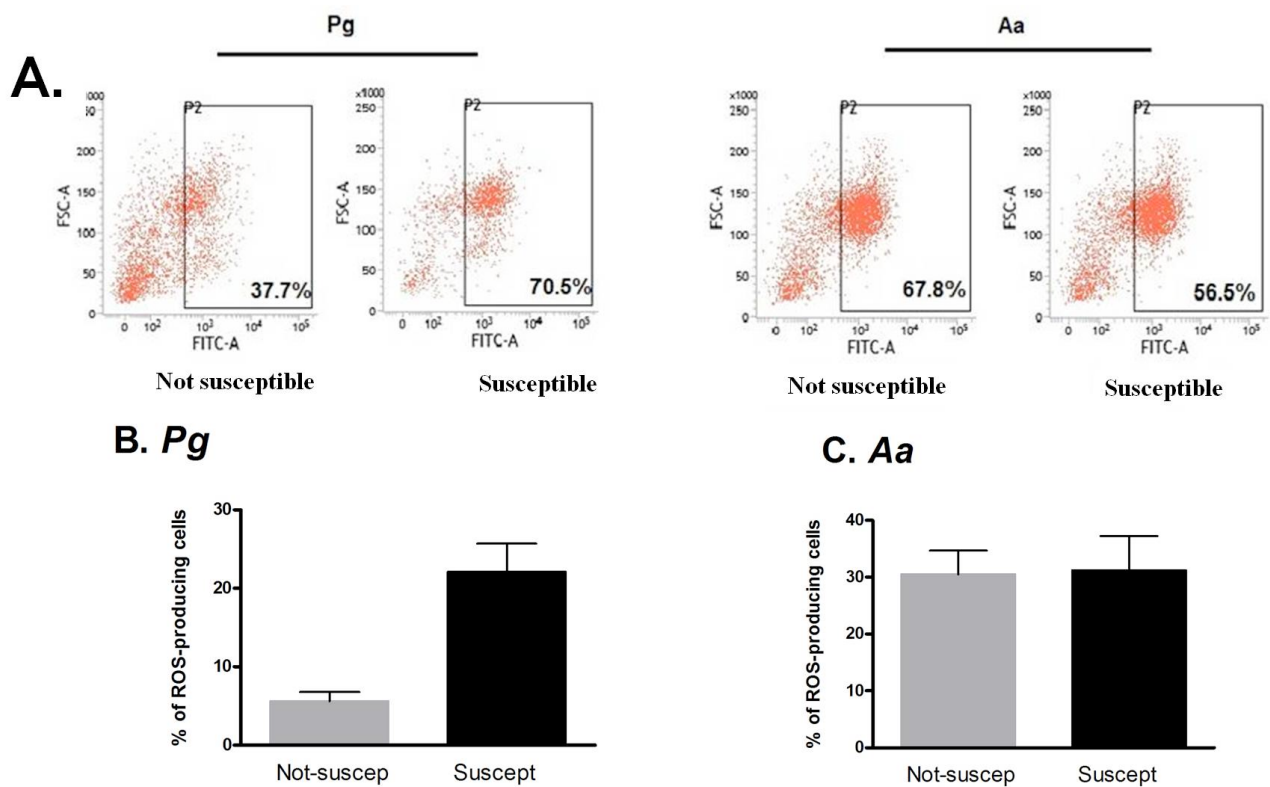
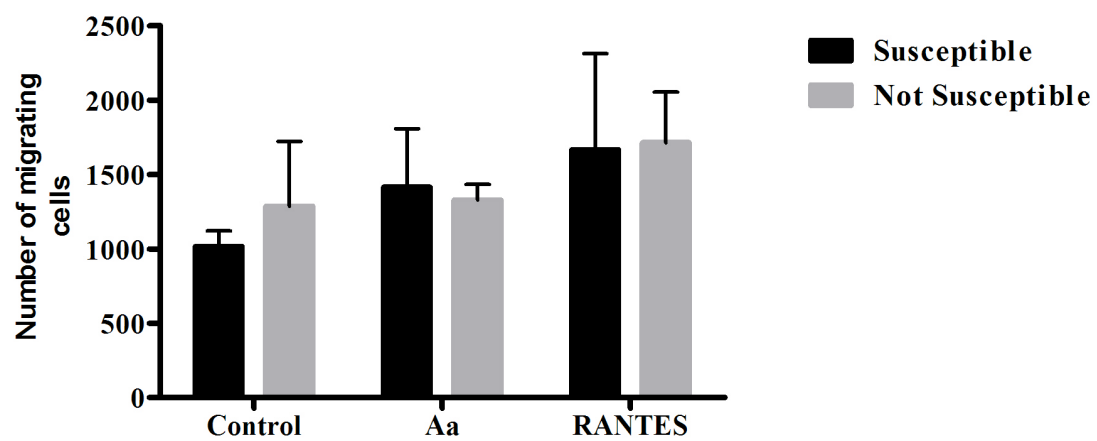


Figure 5: Number of migrating cells assessed in lymphocytes cells from peripheral blood of individuals with the ATC/TTC IL4 (susceptible) or ATT/TTC (Not susceptible) haplotype after RANTES (positive control) or neutrophils supernatant obtained from a patient with the non-susceptibility haplotype to CP conditioned with *Aa* (experimental group) stimuli.



3.2 Publicação 2

Functional role of the ATC/TTC haplotype in the *Interleukin 8* gene in the response of neutrophils and leukocytes to Gram-negative bacteria*

Suzane C. Pigossi^{*}, Giovana Anovazzi^{*}, Livia S Finoti^{*}, Marcell C. de Medeiros^{*}, 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- São Paulo State University, SP, Brazil;

€ Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP- São Paulo State University, 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- São Paulo State University, SP, Brazil.

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

Abstract

Chronic periodontitis (CP) is an inflammatory condition characterized by a sustained host inflammatory-immune response to Gram-negative bacteria present in the dental biofilm. Progression of this condition results in the destruction of alveolar bone and connective tissues supporting the teeth. There is an interestingly inter-individual variability on the severity of CP that cannot be explained solely by the bacterial burden. We have identified a polymorphism in the *Interleukin 8 (IL8)* gene, forming the ATC/TTC haplotype, that is independently associated with a two-fold increase in the susceptibility to chronic periodontitis in comparison with the ATT/TTC haplotype of the *IL8* gene present in not susceptible individuals. In this study, we investigate the functionality of these *IL8* gene haplotypes in the response of neutrophils to CP-associated Gram negative bacteria. We assessed the influence of these two distinct haplotypes on gene expression (RT-qPCR), on the profile of secreted cytokines (multiplex assay) and chemotaxis (boyden chamber assay) in primary PMNs from peripheral blood of healthy individuals. Direct influence of these two haplotypes on *IL8* promoter activity was assessed using genetic constructs driving the expression of green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene. The susceptible haplotype was associated with increased production of pro-inflammatory mediators and increased migration of neutrophils. Increased expression of GFP was observed in the presence of the T allele at the -251 promoter position compared to the ATT and ATC haplotypes. In conclusion, neutrophils from subjects presenting the susceptible *IL8* gene haplotype (ATC/TTC) presented an enhanced response to stimulation with Gram-negative bacteria associated with CP. This enhanced response is dependent primarily on the presence of the T allele in the *IL8* promoter region.

Keywords: Gene polymorphism. Gene expression. Polymorphism functionality. Immunology. Cytokine. Functional analysis. Neutrophils.

Introduction

Periodontal disease is a chronic inflammatory condition initiated and maintained by a complex bacterial biofilm that is considered the most prevalent lytic bone condition in humans [1, 2]. The sustained host inflammatory-immune response in the local tissues may ultimately result in the progressive destruction of the both non-mineralized and mineralized collagenous tissues that support the teeth [3, 4]. Interestingly, susceptibility to this condition varies significantly among different individuals, suggesting that host-related factors play a decisive role in the pathogenesis of this condition [5]. Understanding the biological mechanisms and characteristics involved may be of use not only for the prevention and treatment of chronic periodontitis, but also for other diseases and conditions associated with chronic inflammation, associated with host-microbial interactions or not.

Gram-negative anaerobic / microaerophilic bacteria, including *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) have been considered to be key pathogenic microorganisms associated with the onset and progression of chronic periodontitis [6, 7]. *Pg* is the most-studied bacterial species involved in the etiology of periodontitis, and it has been shown to be able of evading and modulating the host immune responses, driving a shift of the resident microbiota toward a chronic periodontitis-associated microbial community [8, 9]. This bacterium releases copious amounts of outer membrane vesicles containing lipopolysaccharide [10], which can penetrate periodontal tissue [11, 12] and thus activate the innate host response [13]. Similarly, the *Aa* is a non-sporeforming, non-motile, microaerophilic coccobacillus that

affect immune responses by production of potent virulence factors including endotoxin, leukotoxin [14], and a chemotaxis-inhibiting factor [15]. These virulence factors favor the colonization of the oral biofilm, the invasion of gingival epithelium, evasion of host defenses, and may directly participate in the the destruction of connective tissues and interfere with tissue repair [16]. Importantly, the initial interaction between these bacterial species and the host tissues occur with the gingival epithelial cells, which leads to the recruitment of neutrophils, as the first-responders, by production of Interleukin 8 (IL-8) [17].

Phagocytic cells such as neutrophils and macrophages constitute the first line of defense against bacterial infection. Neutrophils have been described as playing a major role in periodontal disease with both protective and destructive influences [18]. These cells are the main responsible for the recruitment of other leukocytes to the gingival crevice via the production of C-X-C and C-C chemokines [18, 19]. As antimicrobial mechanisms, neutrophils produce reactive oxygen species (ROS), antimicrobial peptides, proteases, pro- and anti-inflammatory cytokines and neutrophil extracellular traps (NETs) that bind pathogenic bacteria preventing their invasion/spread into the host tissues [20, 21].

Production of chemokines by cells localized at inflammatory sites induce strong adhesive interactions between the circulating leukocytes and the endothelium. Consequently, the cells are attracted to the inflammatory site by the chemokine concentration gradient [22]. Among the chemokines, the neutrophil chemoattractant IL-8 is an major player in the initiation and maintenance of inflammatory reactions. This chemokine is crucial for local defense against microorganisms by acting in the attraction and activation of neutrophils [23]. In addition, *IL8* mRNA levels in gingival tissues were found to be higher in individuals with chronic periodontitis (CP) in comparison

with healthy individuals, indicating an involvement of IL-8 in the induction and development of the host response associated with chronic periodontitis [24-28].

Recent studies have shown that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes such as *IL2*, *IL6*, *IL10*, matrix metalloproteinase 1 (*MMP1*), and tumor necrosis factor receptor 2 (*TNFR*) are associated with greater prevalence and/or severity of chronic periodontitis [29-33]. Numerous SNPs have been found in the *IL8* gene, some of which are known to be associated with susceptibility to diseases such as asthma and oral lichen planus [34, 35]. In addition, a previous investigation by our research group in 500 individuals with and without CP showed that the ATC/TTC haplotype, formed by -251(T/A) (rs4073), +396(T/G) (rs2227307), and +781(C/T) (rs2227306) polymorphisms in the *IL8* gene was associated with a two-fold increased susceptibility to CP in comparison with the other haplotypes (adjusted odds ratio=2.24, 95% confidence interval=1.10–4.55) [36]. Further clinical studies demonstrated significant positive correlation of this ATC/TTC *IL8* gene haplotype with the concentration of periodontopathogens in the dental biofilm[37], but the functional role of this haplotype was not determined.

In this study we investigate the functionality of ATC/TTC (susceptible) and ATT/TTC (not susceptible) *IL8* gene haplotypes in the response of neutrophils to distinct inflammatory stimuli, including Gram-negative bacteria associated with chronic periodontitis (*Pg* and *Aa*) and ‘generic’ inflammatory stimulus (PMA+ionomycin). The influence of the two distinct *IL8* gene haplotypes was assessed using inflammatory gene expression at mRNA and protein levels, as well chemotaxis after *Aa* and *Pg* stimulation. Mechanistic relevance of the different haplotypes for IL8 promoter activity was studied using gene reporter genetic constructs.

Materials and Methods

Human volunteers

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of School of Dentistry at Araraquara, UNESP, Brazil (Process CAAE 18527813.7.0000.5416)*. The selected individuals consented to participate in this study and donated whole blood that was used in the in vitro experiments. Presence of the ATC/TTC (susceptible) or of the ATT/TTC (not susceptible) haplotypes in the *IL8* gene was verified by sequencing of DNA isolated from cells of the peripheral blood. Calculation of the sample size calculation was performed by the DDS Research (Sample Size Calculator, Average, two samples) utilizing values of *IL8* gene expression from samples of a pilot study. This calculation determined that including six subjects of each haplotype would allow the detection of differences of 0.3 units (with an estimated variation of 0.6 units) between averages of each haplotype at a significance level of 95% and with a power of 80%. Utilizing the obtained data at the end of this study, power calculation analyses were also performed by DDS Research, showing 100% statistical power for gene expressions (n=6 patients each group), 99.5% statistical power for cytokine production (n=5 patients each group), while for the neutrophils migration it was reached 42.9% of statistical power (n=3 patients each group).

All individuals were in good general health and did not make continuous use of any medication. Periodontal clinical examinations were performed on all subjects (n=12, 6 patients each haplotype). Exclusion criteria were: current use or history of use in the previous 4 months of antibiotics or of steroidal or non-steroidal anti-inflammatory medication; current or past history of smoking; presence or history of any autoimmune/allergic condition; presence or history of any systemic diseases that may

*Anexo A

directly affect the immune system (e.g., cancer, diabetes, sexually-transmitted diseases), current pregnancy or lactation.

Bacterial culture and conditions of cell stimulation

A frozen stock of *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) strain ATCC 33277 was grown on plates of Tryptic Soy Agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood, 0.5 mg/mL hemin and 1mg/mL menadione. A frozen stock of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) strain JP2 was grown on Tryptic Soy Agar containing 0.6% w/v yeast extract. Both cultures were maintained in an anaerobic chamber at 37 °C in 85% N₂, 5% CO₂ and 10% H₂ for 2 to 3 days and harvested at the mid-logarithmic phase of growth. To calculate the amount of bacteria for the stimulus we adjusted an OD of 0.5 (*Pg*) and 0.2 (*Aa*) in a wavelength of 495 nm, which was determined to correlate to 10⁷ CFU/mL.

Isolation of primary neutrophils and gene expression by RT-qPCR

Peripheral blood was collected by venipuncture always in the morning, with a fasting period of no less than 8 h using EDTA/K3-containing vacutainer tubes (Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA). Approximately 20 mL of whole blood was collected from each subject (n=6 of each haplotype group) at each draw. Isolation of neutrophils was performed by a centrifugation in a double-gradient of Histopaque (Sigma, St Louis, MO, USA). After separation, the neutrophils were cultured overnight in RPMI 1640 supplemented with 1% (vol:vol) of heat-inactivated fetal bovine serum. 5 × 10⁵ PMNs/mL were stimulated for 4 h with 50 ng/μL of PMA (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA) and 500 ng/μL of ionomycin calcium salt (I) (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA) or with 5 ng/μL of recombinant human interleukin-1β (IL-1β; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Negative control cells were kept in culture

medium. Total RNA was extracted using an affinity column system including treatment to eliminate possible genomic DNA contaminants (RNAqueous kit, Ambion Inc., Austin, TX, USA). Concentration of RNA was determined in a microvolume spectrophotometer (NanoView Plus, GE Healthcare, Munich, Germany) and 300 ng of total RNA were used for cDNA synthesis using random hexamer primers and reverse transcriptase (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific). Real-time PCR was performed using TaqMan chemistry (TaqMan Fast Advanced Master Mix, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) and pre-designed and optimized sets of primers and probe (TaqMan gene expression assays, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) for the detection of *IL-4* (Hs00174122_m1), *IL-8* (Hs00174103_m1), *IL-12* (Hs01073447_m1), and *TNF- α* (Hs01113624_g1). Expression of *GAPDH* (Hs02758991_g1) was used as the endogenous control for normalization. Since all experimental conditions were performed in aliquots of cells from each individual donor, regulation of target gene expression was determined as fold change over non-stimulated control for each donor, to account for individual variations in gene expression. The fold change values for each target gene in each of the six donors were then averaged and compared between the susceptible and not susceptible haplotypes for each stimuli.

Cytokine production

In these experiments, we used whole blood collected from 5 individuals of each of the two *IL8* gene haplotypes investigated. Equal volumes of whole blood containing 1×10^6 cells and RPMI 1640 supplemented with 20% heat-inactivated FBS were combined and immediately stimulated with live *Pg* and *Aa* for 12 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. At the end of the stimulation period, the levels of selected candidate proteins related with inflammation were measured using a bead based multiplex assay (Human Cytokine

25-Plex Panel, cat#LHC0009, Invitrogen) on a Bioplex 200 (Bio-Rad Laboratories), following the manufacturer's instructions. In this assay, the following proteins were quantitated: 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

Chemotaxis assay

In this assay, we used neutrophils isolated from the whole blood of three individuals from each of the two *IL8* gene haplotypes investigated. Chemotaxis was determined in a boyden chamber assay (transwell® inserts with polycarbonate membrane of 3.0 μ m diameter pores; Corning Incorporated, USA). The isolated neutrophils (1×10^6 cells/well) were submitted to three experimental conditions for 30 minutes: in the negative control samples, RPMI 1640 culture medium supplemented with 1% heat-inactivated FBS without antibiotics was added in the lower compartment; in the positive control samples, 100 ng/ μ l of recombinant human IL-8 (R&D Systems, Minneapolis, MN) was used as chemoattractant in the lower compartment, and in the experimental samples, supernatant from neutrophil cultures (from a single individual presenting the not susceptible haplotype) that were stimulated with heat-killed *Aa* (10 bacteria: 1 cell) for 6 hours was added to the lower compartment as chemoattractant. After 30 minutes, cells on the upper side (facing the upper compartment) of the membranes were gently removed using a sterile cotton swab and the membranes were stained with DAPI (1 μ g/mL, 5 min, room temperature). The number of lymphocytes migrating into the lower side of the membrane (facing the lower chamber) were counted in five 200X

magnification fields using an inverted fluorescent microscope (Evos FL, AMG Micro). Cell counting was performed automatically using Image J software, version 1.x [38] by standardizing a threshold for the blue color detection that allowed the detection migrating lymphocytes with nuclei stained by DAPI.

***IL8* gene haplotype constructs**

GFP reporter plasmid (pAcGFP1-1, Clontech Lab. Inc, cat#632497, Mountain View, CA, USA) including a 1 kb fragment of the proximal human *IL8* gene promoter were obtained commercially (GenScript Company), including the -251 SNP between the -891 to -1526 nucleotide positions of the GenBank # M28130.1. Polymorphisms in the intron 1 region (820pb; comprising +396 and +781 SNPs) of the *IL8* gene were also included in the construct (Figure 1a) by inserting the corresponding intronic sequence immediately after the coding sequence of the GFP reporter gene vector and before the poly-A site (Figure 1b). In this ATC construct obtained commercially, we used PCR-based site-directed mutagenesis to obtain constructs with the TTC and ATT alleles (Table 1). The final constructs were verified 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 using the sequence of the commercially-obtained (M23442 GenBank database).

Transfection and GFP reporter assay

The following constructs were used in these experiments: a plasmid containing only the promoter sequence of the *IL8* gene without the presence of SNPs +396 (C/T) and +781 (C/T), referred here as the ‘T Promoter’ (because it contains the T allele in the -251 SNP); the ATC plasmid that was obtained commercially; and the plasmids with the

ATT or TTC alleles that were prepared through site-directed mutagenesis. These constructs were transiently transfected in JM cells (human T lymphocytic cell line) by combination of electroporation/cationic reagents (Neon system, Invitrogen Corp, ThermoFisher Scientific). The effects of the different polymorphisms on promoter activity was assessed by the expression of GFP reporter gene using flow cytometry. JM cells (2×10^7 cells/mL) were transfected with 10 μ g of plasmid using three pulses of 10 milliseconds each at 1350 V. After transfection, cells were recovered by incubation in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum for 24h. 5×10^5 cells were stimulated for 24 h with PMA (50 ng/ μ L) + ionomycin (500 ng/ μ L), recombinant human IL-1 β (5 ng/ μ L), heat-killed *Aa* or *Pg* (10 microorganisms : 1 cell). Three independent experiments were performed and analyzed in triplicate.

Statistical analysis

The purpose of the analysis was to compare the outcomes of interest according to the two investigated *IL8* gene haplotypes. Initially, the distribution of the data was analyzed using the D'Agostino-Pearson test; then non-parametric tests were performed (Mann-Whitney) utilizing GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc.). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

There were no differences in the demographic profile and periodontal status between the groups of individuals carrying the 'susceptible' or 'not susceptible' *IL8* gene haplotypes (Table 2) ($p > 0.05$). Of note, all individuals were considered periodontally healthy (less than 10% marginal bleeding, no sites with periodontal attachment loss greater than 3 mm).

Gene expression by neutrophils

Expression levels of *IL-4*, *IL-8*, *IL-12* and *TNF- α* are shown in the Figure 2. Although there are no significant differences, bacterial stimulation (*Aa* and *Pg*) caused a distinct increase in *IL4* expression in neutrophils from individuals presenting the susceptible *IL8* gene haplotype. Considering the unstimulated neutrophils (negative control) as reference, none of the stimuli induced expression of *IL12*, regardless of the *IL8* gene haplotype. Moreover, there were no significant differences on *IL12* expression between the two investigated *IL8* gene haplotype. Among the selected candidate cytokine genes, *IL-8* was the most prominently expressed. *Pg* and *Aa* induced a significant increase of *IL-8* mRNA, which was more marked in neutrophils of from individuals carrying the susceptible haplotype. Interestingly, *Aa* was the most potent inducer of *IL-8* gene expression. *TNF- α* gene expression was also induced by both *Pg* and *Aa*, and expression was higher in neutrophils from individuals carrying the susceptible *IL8* gene haplotype in comparison with that of neutrophils from individuals carrying the not susceptible *IL8* gene haplotype.

Cytokine production

In these experiments we used whole blood containing all leukocytes to allow for a comprehensive assessment of the influence of *IL8* gene haplotypes on the response to Gram-negative bacteria, including the reciprocal influence among the distinct cell types through paracrine effects of secreted soluble mediators and direct cell-to-cell interactions. Of the 25 cytokines assessed, *IL-2*, *IL-7* and *IL-13* were not detected. In the *IL8* gene susceptible haplotype, we observed increased levels of *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8* and *TNF- α* pro-inflammatory cytokines after stimulation with *Pg* (Figure 3A). Production of cytokines associated with the Th1/Th2-type responses suggests a skew to

the Th1 response after stimulation with *Pg* in the *IL8* susceptible haplotype, as indicated by increased levels of IFN- γ and also by the higher production of IL-2R (Figure 3B). In contrast, IL-10 production was higher in the *Pg*-stimulated leukocytes from individuals carrying the not susceptible *IL8* gene haplotype. Interestingly, stimulation of leukocytes from individuals carrying the susceptible *IL8* gene haplotype with *Aa* increased production of IL-10 significantly; however *Pg* was a more potent inducer of IL-10 production (Figure 3B). There were no differences between leukocytes from individuals with the different *IL8* gene haplotypes in the production of chemokines (Figures 4A, 4B), except for MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES that were all significantly higher in leukocytes from individuals carrying the susceptible *IL8* gene haplotype..

Chemotaxis of neutrophils

We used IL-8 or supernatant from cultures of *Aa*-stimulated neutrophils (from a single individual carrying the not susceptible *IL8* gene haplotype) as chemotactic stimuli in the lower compartment of the boyden chamber. There was a non statistically significant trend towards increased chemotaxis to IL-8 by neutrophils from individuals with the susceptible *IL8* gene haplotype; however there was no difference in the chemotaxis towards the supernatant of *Aa*-stimulated neutrophils between cells from individuals of the two investigated *IL8* gene haplotypes (Figure 5).

***IL8* promoter activity**

JM cells transfected with the X different GFP reporter constructs and stimulated with heat-killed *Aa* or *Pg*. Overall, higher levels of GFP expression were observed in JM cells transfected with the T promoter construct, followed by the TTC haplotype (common for the two types of investigated *IL8* gene haplotypes). There was a significant difference in the GFP expression between the ATC (part of the susceptible

IL8 gene haplotype) and ATT (part of the *IL8* not susceptible haplotype) plasmids in comparison with the T promoter sequence (Figure 6). Considering all stimuli the construct with the ATC allele (susceptible haplotype) was associated with a mean 5.4 fold decrease on GFP expression in comparison with the T promoter construct; whereas the construct with the ATT allele was associated with a mean 4.8 fold decrease on reporter gene expression. Presence of the TTC allele, for all stimuli combined there was an approximate 3.5 fold increase in GFP expression in comparison with the ATC (susceptible haplotype) and ATT alleles (not susceptible haplotype).

Discussion

In this study we investigated the functionality of two different haplotypes in the *IL8* gene in the response of neutrophils to Gram-negative bacteria. IL-8 is a major chemoattractant for neutrophils [17], an innate immunity cell type that is consistently present in the chronically inflamed connective tissues in chronic periodontitis (CP). [19]. We have previously reported that individuals presenting the ATC/TTC haplotype ('susceptible') in the *IL8* gene were significantly more susceptible to CP when compared with individuals carrying the ATT/TTC ('not susceptible') [36]. These two *IL8* gene haplotypes are formed by the -251(T/A) (rs4073), +396(T/G) (rs2227307), and +781(C/T) (rs2227306) polymorphisms.

Since this was conceived as an in vitro study, the fact that our sample of human donors carrying both *IL8* gene haplotypes was homogenous regarding demographic data and presented a similar status of periodontal health (Table 2), there were no biases introduced by variations in the basal phenotype of the neutrophils and leukocytes associated with pre-existing conditions. Nevertheless, it should be noted that it is

possible that these individuals carry a myriad of other genetic polymorphisms in other immune-relevant genes that can possibly affect the outcomes assessed in this study.

IL-8 gene expression was significantly increased after bacterial stimulation in neutrophils from individuals presenting the susceptible haplotype. This indicates that this haplotype is functional and suggests an increase in the transcriptional activity of the *IL8* gene in neutrophils. IL-8 protein production by peripheral blood leukocytes of individuals carrying the susceptible haplotype was also significantly higher after stimulation with either Gram-negative bacterial species associated with chronic periodontitis (*Aa* and *Pg*). Collectively, these results demonstrated the functional impact of the susceptible *IL8* gene haplotype at both transcriptional and translational levels of IL-8. It is important to consider that these results were obtained in controlled assays *in vitro*. In a previous clinical study assessing periodontal patients presenting the same *IL8* gene haplotypes, there were no differences in IL-8 protein levels in the gingival crevicular fluid (GCF) [39, 40]. This discrepancy may be related with the net effect of the highly complex cytokine network established *in vivo*, since multiple cell types (both immune cells and stromal/resident cells) participate in the host response and their secreted products have autocrine and paracrine effects that may be either stimulatory or inhibitory for the production of IL-8. Alternatively, it is also possible that the experimental approach of assessing IL-8 in GCF does not adequately represent the status of IL-8 production in the tissues, since it is an exsudate that accumulates in the gap between the connective gingival tissue and the tooth, which is subjected to the influence of host- and bacterial-derived proteases.

Destruction of mineralized and non-mineralized connective tissues surrounding the tooth (the periodontal tissues) is the hallmark of chronic periodontitis. It is generally accepted that this destruction is mostly mediated as a ‘side-effect’ of the host response

to the microorganisms in the dental biofilm (PMIDs 26257165, 9551997, 11284536, 12195378). Thus, increased production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , Interferon- γ (IFN- γ), IL-1 β , IL-12 and IL-6 [41] are associated with increased severity (tissue destruction). Neutrophils and leukocytes from individuals carrying the susceptible *IL8* gene haplotype presented an exacerbated response to stimulation of Gram-negative bacteria, with higher levels of TNF- α (mRNA and protein), IL-1 β , IL-2R and IFN- γ (protein). These results suggest that the increased susceptibility and greater severity of chronic periodontitis in the individuals carrying the susceptible haplotype in the *IL8* gene may be biologically mediated by an exacerbated response of neutrophils. This hypothesis is supported by the findings of a previous clinical study showing that more severe periodontal destruction occur in individuals carrying the *IL8* susceptible haplotype in comparison to individuals carrying the not susceptible *IL8* gene haplotype and that this increased severity occurs in response to a lower microbial challenge [37].

Cytokines such as IL-10, IL-1 receptor antagonist (IL1-RA) and IL-4 have marked suppressive and anti-inflammatory properties, which are mediated by their capacity to inhibit the transcription of pro-inflammatory cytokines [41, 42]. Interestingly, we observed a differential regulation of the IL-10 with stimulation using *Aa* and *Pg*, which is likely related to the distinct virulence factors and antigens, including the molecular structure of the lipopolysaccharide [43]. Stimulation with *Aa* induced higher levels of IL-10 in cells from individuals carrying the susceptible haplotype in the *IL8* gene. Increased IL-10 may suggest a suppression of the protective function of neutrophils [44], resulting in increased susceptibility to *Aa* infection in individuals carrying the susceptible *IL8* gene haplotype. Surprisingly, after stimulation with *Pg*, cells from individuals with the susceptible *IL8* gene haplotype expressed lower

levels of IL-10 (Figure 3B). We speculate that the increased secretion of TNF observed in these cells after stimulation with *Pg* may have an autocrine/paracrine inhibitory effect in the expression of IL-10 (Figure 3A). Alternatively, considering that the protein levels were assessed using whole blood (i.e., all circulating leukocytes), the discrepancy may be related with the differential response of multiple cell types to this bacterium and also to the net effect associated with the paracrine and autocrine influences of soluble mediators and even cell-to-cell interactions. In fact, patients carrying the susceptible *IL8* gene haplotype presented a skew in the CD4 response to a Th1 phenotype (IFN- γ and IL-2R), whereas patients carrying the not susceptible *IL8* gene haplotype had a CD4-type response shifted to the Th2 phenotype (IL-10 and IL-5) [45].

Leukocytes from individuals carrying the susceptible *IL8* gene haplotype produced more MIP-1 α and MIP-1 β in response to bacterial (*Aa* and *Pg*) stimulation. These chemokines have an extensive overlap in their biological activity, acting as potent chemotactic/activating factors for monocytes, macrophages, natural killer (NK) cells and immature dendritic cells [46, 47]. Moreover, these chemokines serve as chemoattractants for Th1, but not Th2 cells reinforcing their pro-inflammatory character [48]. Similarly, leukocytes from individuals presenting the susceptible *IL8* gene haplotype produced more RANTES, an efficient chemoattractant for Th1 cells (but not for Th2 cells) (24). Therefore, these results suggest that presence of the susceptible haplotype in the *IL8* gene is associated with an exacerbated inflammatory phenotype. Of note, there was a trend towards increased chemotaxis of neutrophils from individuals presenting the susceptible *IL8* gene haplotype, when recombinant IL-8 was used as stimulus, suggesting the possibility of a positive feedback mechanism in which neutrophils from individuals with the susceptible *IL8* gene haplotype produce more IL-8 and are also more sensitive to the chemotactic effects of IL-8. Collectively, these results

are suggestive of an exacerbated inflammatory phenotype associated with the presence of the susceptible *IL8* gene haplotype.

As part of the host defense function, neutrophils can produce various of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α), which have been observed in the diseased periodontal microenvironment [14]. These cytokines may activate other immune and stromal/resident cells and, thus, mediate periodontal tissue destruction by stimulating collagen degradation and bone resorption [49]. Interestingly, the genetic variation in the *IL8* gene did affect mRNA expression of other cytokine genes. The possibilities for this influence include *cis*- or *trans*- effects and changes in the relatively limited pool of transcription factors that are required for expression of various cytokine genes (e.g., AP-1, c-Fos, NF-kB). The short stimulation period (4 h) used in the gene expression experiments minimized the influence of other cytokines in the expression of target genes, allowing for the study of the direct influence of the genetic variation at the transcriptional level. In order to obtain a more comprehensive assessment of the influence of the investigated *IL8* gene haplotypes, protein production was studied in the multiplex assay using the mixed population of leukocytes present in the peripheral circulation using whole blood to account for possible autocrine and paracrine effects of multiple soluble biological mediators produced by the leukocytes.

The gene reporter experiments indicated that presence of the T allele in the promoter region (-251 position) is the most critical feature influencing the activity of *IL8* proximal promoter; whereas the variations in intronic regions do not interfere with the *IL8* gene expression. However, we cannot rule out the possibility that these variations in the intron regions may affect gene expression by influences on distant

enhancer regions or even affecting chromatin remodeling. A previous study using luciferase as the reporter gene in non immune cells (HEK cells) demonstrated that T allele in the promoter region enhance *IL8* gene transcription in comparison with the A allele [50]. In contrast, the first study to investigate the -251 SNP in the *IL8* gene reported that the A allele tended to be associated ($p = 0.07$) with increased production of IL-8 by leukocytes (whole blood) stimulated with LPS from *E. coli* [51]. The controversy regarding the influence of the -251 SNP is compounded by the lack of significant difference on *IL8* promoter activity presenting the A or T alleles in primary respiratory epithelial cells stimulated with TNF [52]. To our knowledge, the functional role of the second SNP, the +396 (rs2227307), has not been studied before. The third SNP, +781 (rs2227306), presence of the T allele was shown to be important for the binding of C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein-beta) in respiratory epithelial cells (46). In this study, the authors suggest that the influence of particular polymorphisms on mRNA abundance may be cell-specific, since this influence of the T allele at the +781 position was observed in primary respiratory epithelial cells, but not in primary lymphocytes.

This is the first study to investigate functional role of three SNPs forming haplotypes in the *IL8* gene. Haplotypes not only are more powerful for detecting susceptibility alleles than individual polymorphisms, but they also may give more insight into the etiopathological mechanisms. It is important to note, based on other studies assessing the functionality of *IL8* gene polymorphisms, that the influence of genetic variants on the transcriptional levels depends on the study design, particularly the cell type and the nature of the stimulus. In this study the influence of the two distinct haplotypes on *IL8* promoter activity was assessed using gene reporter plasmid constructs, an approach that is similar to that used to investigate the transcriptional effect of an intronic

polymorphism in the *MYLK* gene [53]. Our results are in agreement with those of a previous study that only assessed the influence of the SNP in the promoter region of the gene [50], suggesting that presence of the T allele in the -251 position is the most critical feature affecting *IL8* promoter activity.

The main limitation of this study is the small number of individuals donating blood for the experiments. Moreover, the 'n' of individuals donating blood for the different experiments varied, according to their consent and willingness to participate. It is important to consider that the human genome may carry thousands of variations such as the SNPs investigated here, and a myriad of other polymorphisms in immune response-related genes may be simultaneously present in different individuals and affect the results introducing variability. However, including a large number of individual donors is unfeasible and in spite of the small 'n' and inter-individual variability, the results show a clear trend of biological relevance. The lack of statistical significance is likely to be related with the small sample size and to the use of non-parametric statistical test.

In conclusion, this study provides novel, consistent and relevant information on the functional role of two distinct haplotypes in the *IL8* gene in the response of neutrophils and leukocytes to Gram-negative bacteria associated with chronic periodontitis. Importantly, the information provided in this study is relevant for other chronic inflammatory conditions that are of infectious origin or not. Presence of the ATC/TTC haplotype causes an exacerbated response of neutrophils and leukocytes to Gram-negative bacteria, and the studies using a gene reporter approach indicate that presence of the T allele at the -251 position is critical for the increased activity of the *IL8* promoter.

Acknowledgments

This study was supported by State of São Paulo Foundation Research (FAPESP) grant #2013/17887-8 and #2014/04638-2 and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant #141787/2014-7.

References

1. Gjermo P, Rosing CK, Susin C, Oppermann R. Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontology* 2000 2002; 29:70-8.
2. Albandar JM. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dental clinics of North America* 2005; 49:517-32, v-vi.
3. Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldivar M, Puente J, Martinez B, et al. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *Journal of periodontal research* 2005; 40:199-207.
4. DeCarlo AA, Jr., Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of dental research* 1997; 76:1260-70.
5. Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. *Journal of the International Academy of Periodontology* 2005; 7:3-7.
6. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000 1994; 5:78-111.
7. van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of clinical periodontology* 2002; 29:1023-8.
8. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology* 2000 1997; 14:12-32.

9. Teixeira SR, D'Epiro TT, Pinheiro ET, Simionato MR, Taniwaki NN, Kisielius JJ, et al. Lineage variability in surface components expression within *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial pathogenesis* 2014; 77:100-4.
10. Grenier D, Bertrand J, Mayrand D. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles promote bacterial resistance to chlorhexidine. *Oral microbiology and immunology* 1995; 10:319-20.
11. Schwartz J, Stinson FL, Parker RB. The passage of tritiated bacterial endotoxin across intact gingival crevicular epithelium. *Journal of periodontology* 1972; 43:270-6.
12. McCoy SA, Creamer HR, Kawanami M, Adams DF. The concentration of lipopolysaccharide on individual root surfaces at varying times following in vivo root planing. *Journal of periodontology* 1987; 58:393-9.
13. Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infection and immunity* 2004; 72:5041-51.
14. Zambon JJ, DeLuca C, Slots J, Genco RJ. Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line. *Infection and immunity* 1983; 40:205-12.
15. Van Dyke TE, Bartholomew E, Genco RJ, Slots J, Levine MJ. Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. *Journal of periodontology* 1982; 53:502-8.
16. Wilson M, Henderson B. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *FEMS microbiology reviews* 1995; 17:365-79.
17. Huang GT, Haake SK, Park NH. Gingival epithelial cells increase interleukin-8 secretion in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* challenge. *Journal of periodontology* 1998; 69:1105-10.
18. Dennison DK, Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontology* 2000 1997; 14:54-78.
19. Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000 2003; 31:55-76.

20. Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of experimental medicine* 2013; 210:1283-99.
21. Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* 2014; 124:710-9.
22. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *Journal of periodontology* 2000; 71:1535-45.
23. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* 1991; 11:81-128.
24. Andia DC, de Oliveira NF, Letra AM, Nociti FH, Jr., Line SR, de Souza AP. Interleukin-8 gene promoter polymorphism (rs4073) may contribute to chronic periodontitis. *J Periodontol* 2011; 82:893-9.
25. Cesar-Neto JB, Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Smoking modulates interleukin-6:interleukin-10 and RANKL:osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. *J Periodontal Res* 2007; 42:184-91.
26. Venza I, Visalli M, Cucinotta M, De Grazia G, Teti D, Venza M. Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes. *J Periodontol* 2010; 81:99-108.
27. 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; 62:4005-14.
28. 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* 2017; 96:e6932.
29. 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. *Journal of clinical periodontology* 2002; 29:587-91.
30. 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. *Journal of clinical periodontology* 2003; 30:438-42.
31. Crena J, Subramanian S, Victor DJ, Gnana PP, Ramanathan A. Single nucleotide polymorphism at -1087 locus of interleukin-10 gene promoter is associated with severe chronic periodontitis in nonsmoking patients. *European journal of dentistry* 2015; 9:387-93.
 32. 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. *Journal of periodontology* 2006; 77:1850-5.
 33. 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. *Journal of clinical periodontology* 2004; 31:463-9.
 34. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004; 114:671-6.
 35. Dan H, Liu W, Zhou Y, Wang J, Chen Q, Zeng X. Association of interleukin-8 gene polymorphisms and haplotypes with oral lichen planus in a Chinese population. *Inflammation* 2010; 33:76-81.
 36. 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. *Biochemical genetics* 2011; 49:292-302.
 37. Finoti LS, Corbi SC, Anovazzi G, Teixeira SR, Steffens JP, Secolin R, et al. Association between IL8 haplotypes and pathogen levels in chronic periodontitis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 2013; 32:1333-40.
 38. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 2012; 9:671-5.
 39. 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.

40. Corbi SC, Finoti LS, Anovazzi G, Tanaka MH, Kim YJ, Secolin R, et al. Clinical outcomes of periodontal therapy are not influenced by the ATC/TTC haplotype in the IL8 gene. *Journal of periodontal research* 2014; 49:489-98.
41. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta odontologica Scandinavica* 2001; 59:167-73.
42. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research* 2010; 89:1349-63.
43. Anovazzi G, Medeiros MC, Pigossi SC, Finoti LS, Mayer MP, Rossa CJ, et al. Functional Haplotypes in Interleukin 4 Gene Associated with Periodontitis. *PloS one* 2017; 12:e0169870.
44. Champaiboon C, Yongvanitchit K, Pichyangkul S, Mahanonda R. The immune modulation of B-cell responses by *Porphyromonas gingivalis* and interleukin-10. *Journal of periodontology* 2000; 71:468-75.
45. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today* 1996; 17:138-46.
46. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annual review of immunology* 1991; 9:617-48.
47. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Advances in immunology* 1994; 55:97-179.
48. Siveke JT, Hamann A. T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol* 1998; 160:550-4.
49. Trevani AS, Chorny A, Salamone G, Vermeulen M, Gamberale R, Schettini J, et al. Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. *European journal of immunology* 2003; 33:3164-74.
50. 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. *Respiratory research* 2011; 12:73.
51. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 2000; 55:1023-7.

52. Hacking D, Knight JC, Rockett K, Brown H, Frampton J, Kwiatkowski DP, et al. Increased in vivo transcription of an IL-8 haplotype associated with respiratory syncytial virus disease-susceptibility. *Genes and immunity* 2004; 5:274-82.
53. 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; 90:299-308.

Table 1: Site-directed mutations

<i>IL8</i> haplotypes	Mutation	Primers (5' – 3')
ATC	a	-
<u>TTC</u>	A1277T ^b	Forward: <u>ctagaaataaaaaagcatacaT</u> ttgataattcaccaaattgtg Reverse: <u>cacaatttggtgaattatcaaA</u> tgtatgctttttatttctag
<u>ATT</u>	C2948T ^b	Forward: <u>ctctaactcttatataggaagtT</u> gttcaatgtgtcagttatgac Reverse: <u>gtcataactgacaacattgaacA</u> acttctatataagagttagag
^a Construct synthesized by GenScript. ^b Mutation site from the first nucleotide of the cloned promoter. In bold and underlines are the mutated nucleotide by the site-directed mutagenesis reaction.		

Table 2: Demographic profile and periodontal variables of the patients enrolled in the study.

Haplotypes/Characteristics	Susceptible (n=6)	Not Susceptible (n=6)	<i>p</i>
Median Age (min-max)	56.33 (± 3.5)	50.00 ± (4.6)	0,3050
Gender (%)			
Female	3 (50.0)	4 (90.0)	1,00
Male	3 (50.0)	2 (10.0)	
N° of teeth (median(min-max))	23.00 (± 1.9)	24.83 (± 1.5)	0,4748
BoP (%; median(min-max))	25.93 (± 8.6)	19.83 (± 9.1)	0,6375
PPD (mm; (median(min-max)))	1.912 (± 0.12)	1.968 ± (0.17)	0,7945
CAL (mm; (median(min-max)))	2.433 ± (0.27)	2.288 (± 0.22)	0,6903
n = individuals number; % = percentage of the number of individuals; BOP = Bleeding on Probing; PPD = Periodontal Probing Depth; CAL = Clinical Attachment Level			

Figures

Figure 1: Schematic representation of the *IL8* gene and plasmid map (pAcGFP1-1 - Clontech). (a) *IL8* gene with the following polymorphism positions: -251 (A/T) in the promoter, +396 (C/T) and +781 (C/T) in the intron 1 (i1). (b) Map of the plasmid used for construction of the investigated *IL8* haplotype. Synthesized 1 kb sequence corresponding to *IL8* promoter (-950 to +50 nucleotide) comprising the +396SNP was inserted upstream from the GFP reporter gene. In addition, a synthesized sequence corresponding to the intron 1 of *IL8* was inserted downstream of the reporter gene.

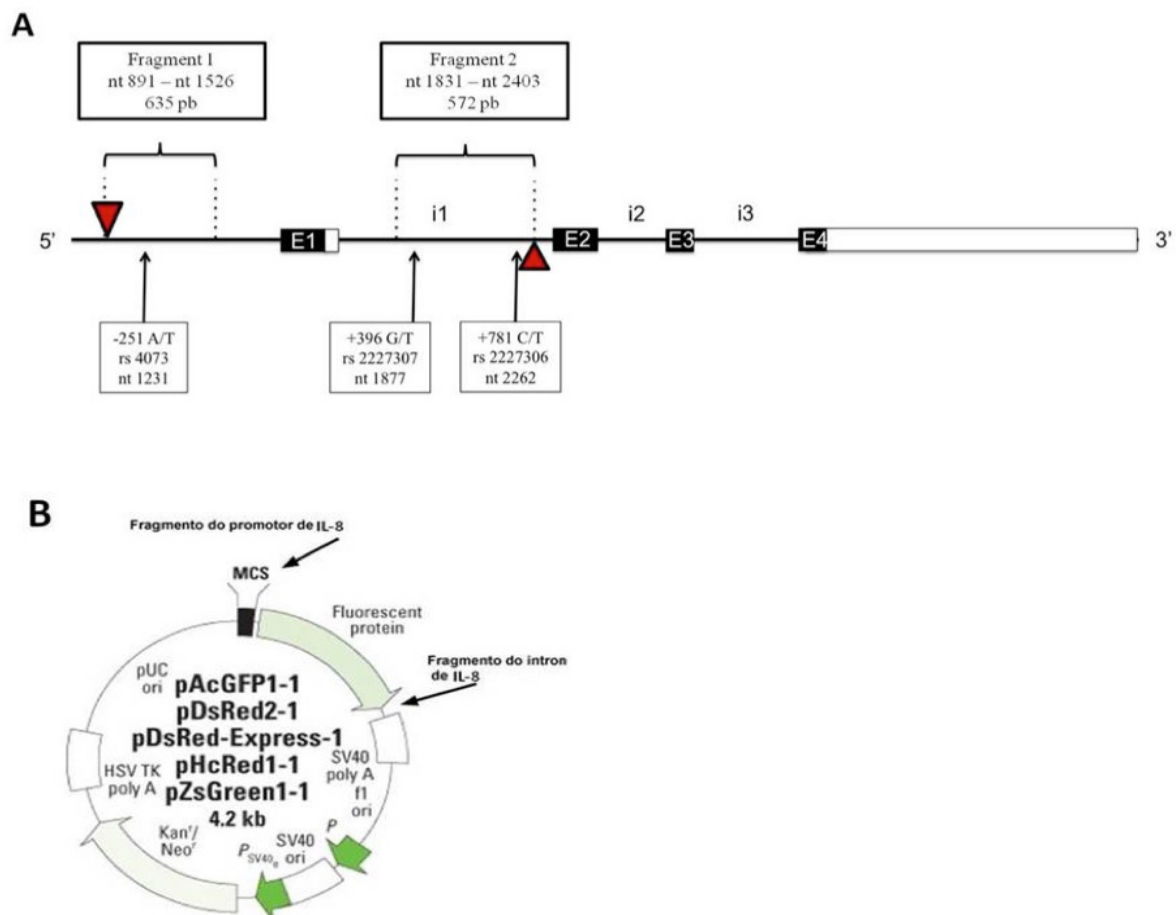


Figure 2: Gene expression of *IL4*, *IL8*, *IL12* and *TNF α* assessed in neutrophils from peripheral blood of individuals with the ATC/TTC *IL4* (susceptible) or ATT/TTC (Not susceptible) haplotype after PMA+I, IL-1 β , *Aa* or *Pg* stimuli. The mRNA levels (normalized by GAPDH) are represented in fold change. Mean values of the relative gene quantifications of the susceptible and not susceptible groups are represented in columns, and bars show standard deviations. * $p \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

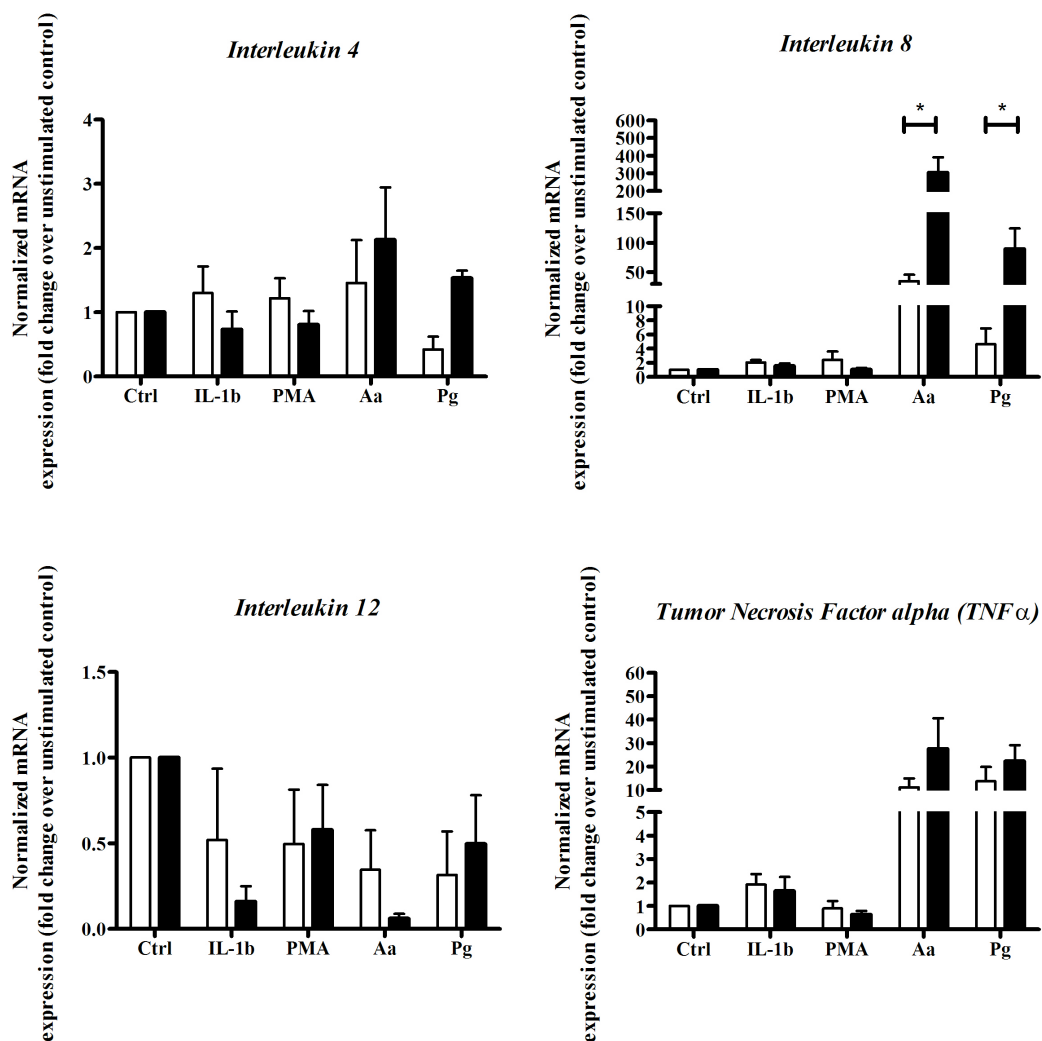
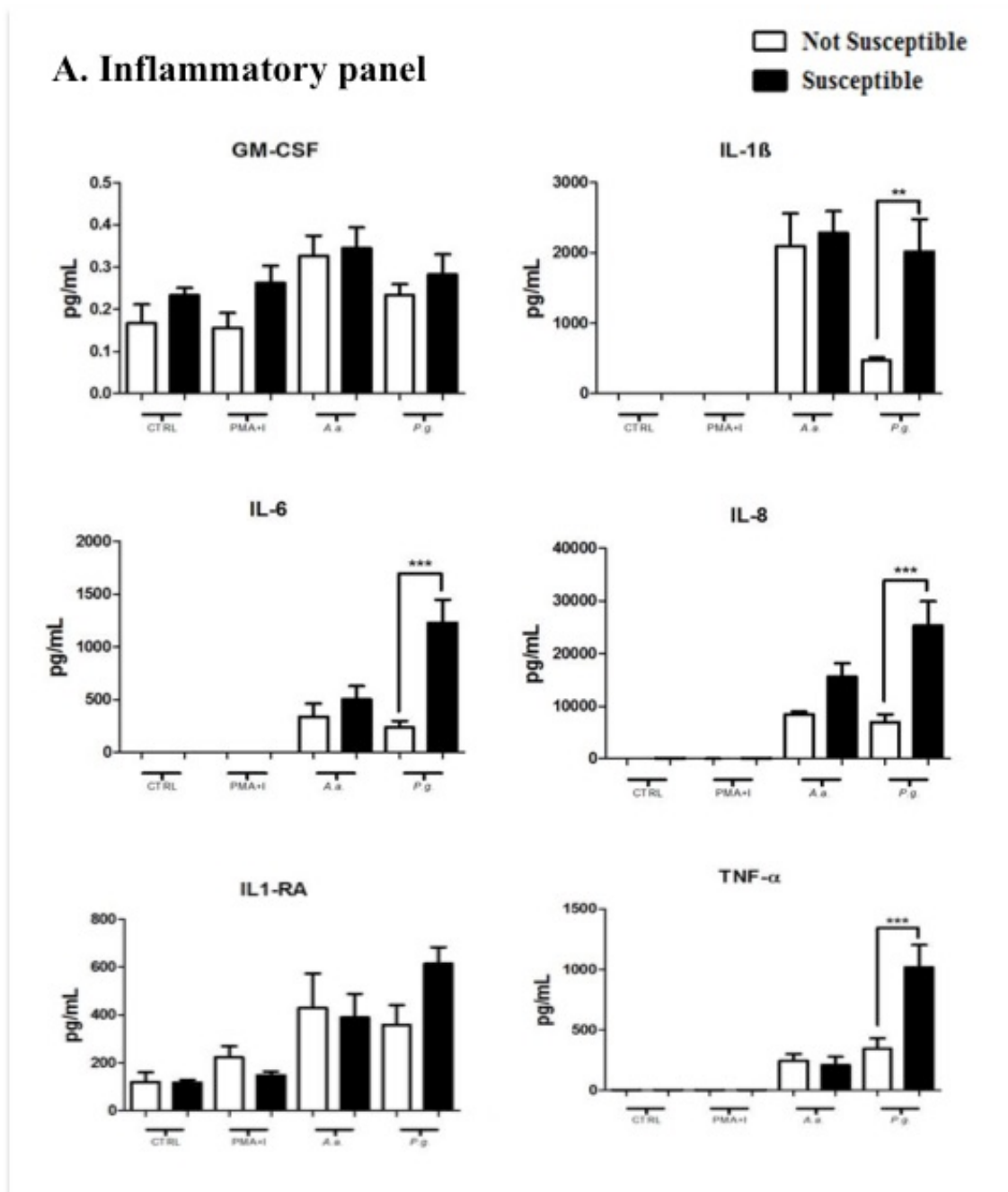


Figure 3: A. Inflammatory Panel B. Th1/Th2 Panel represented by the proteins analyzed by a multiplex assay in the whole blood of subjects carrying susceptible or not susceptible haplotypes after PMA+I, *Aa* and *Pg* stimulation. The concentration is expressed in pg/mL. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



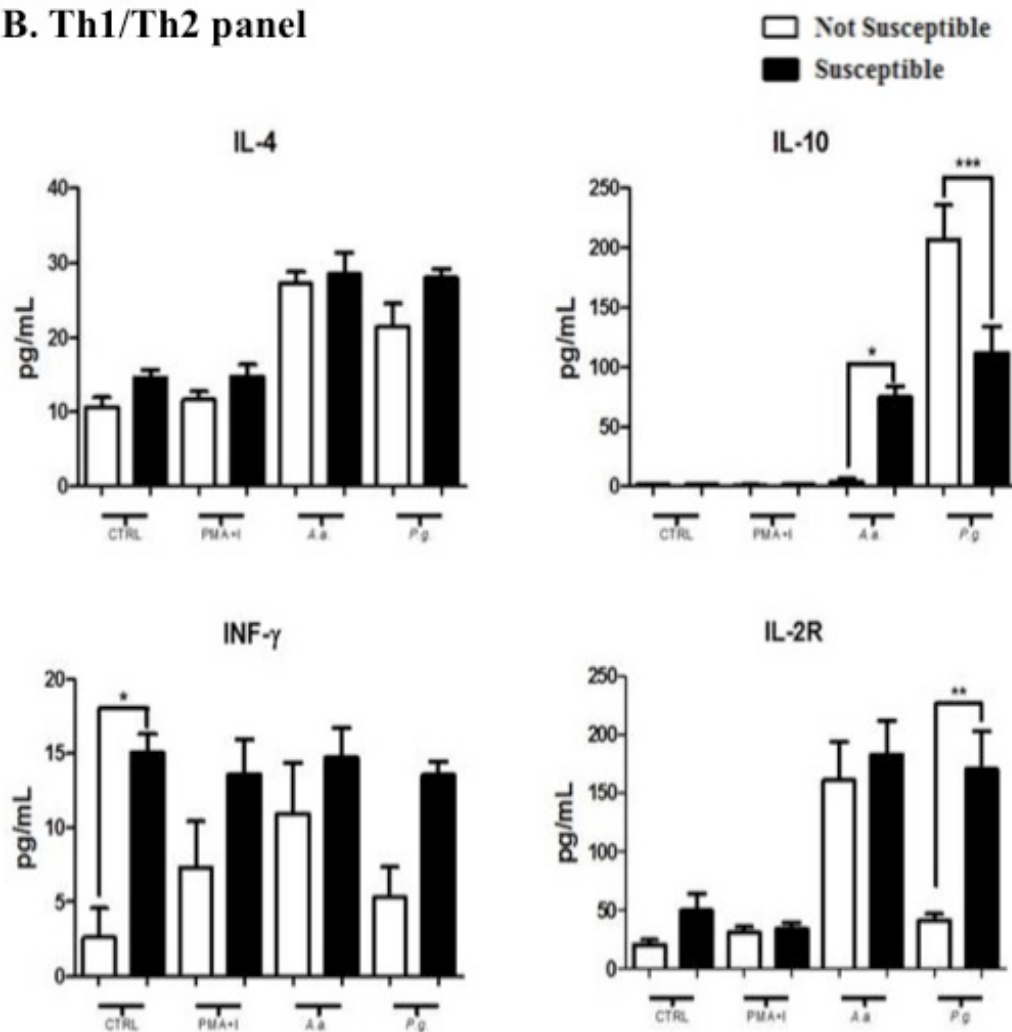
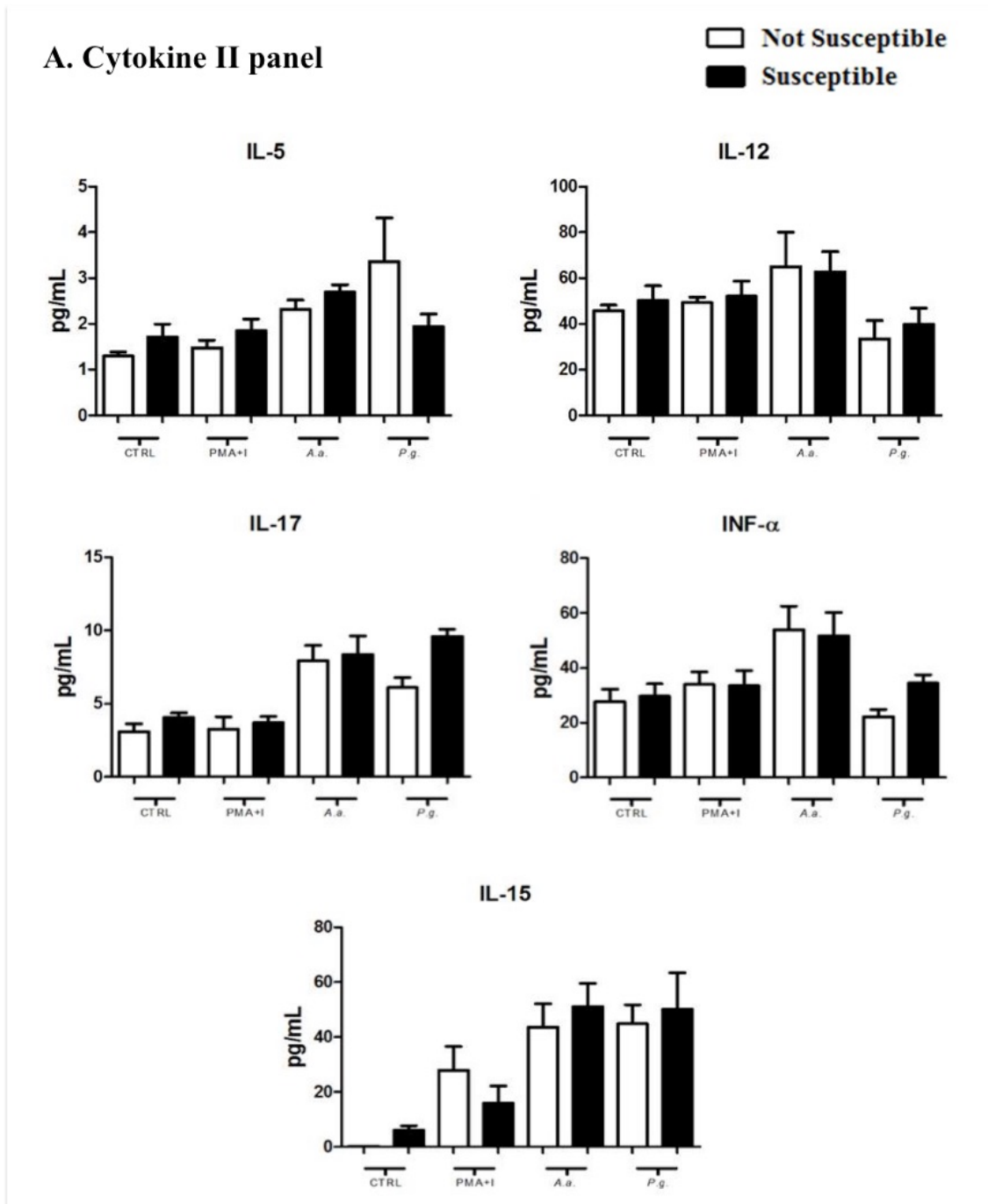
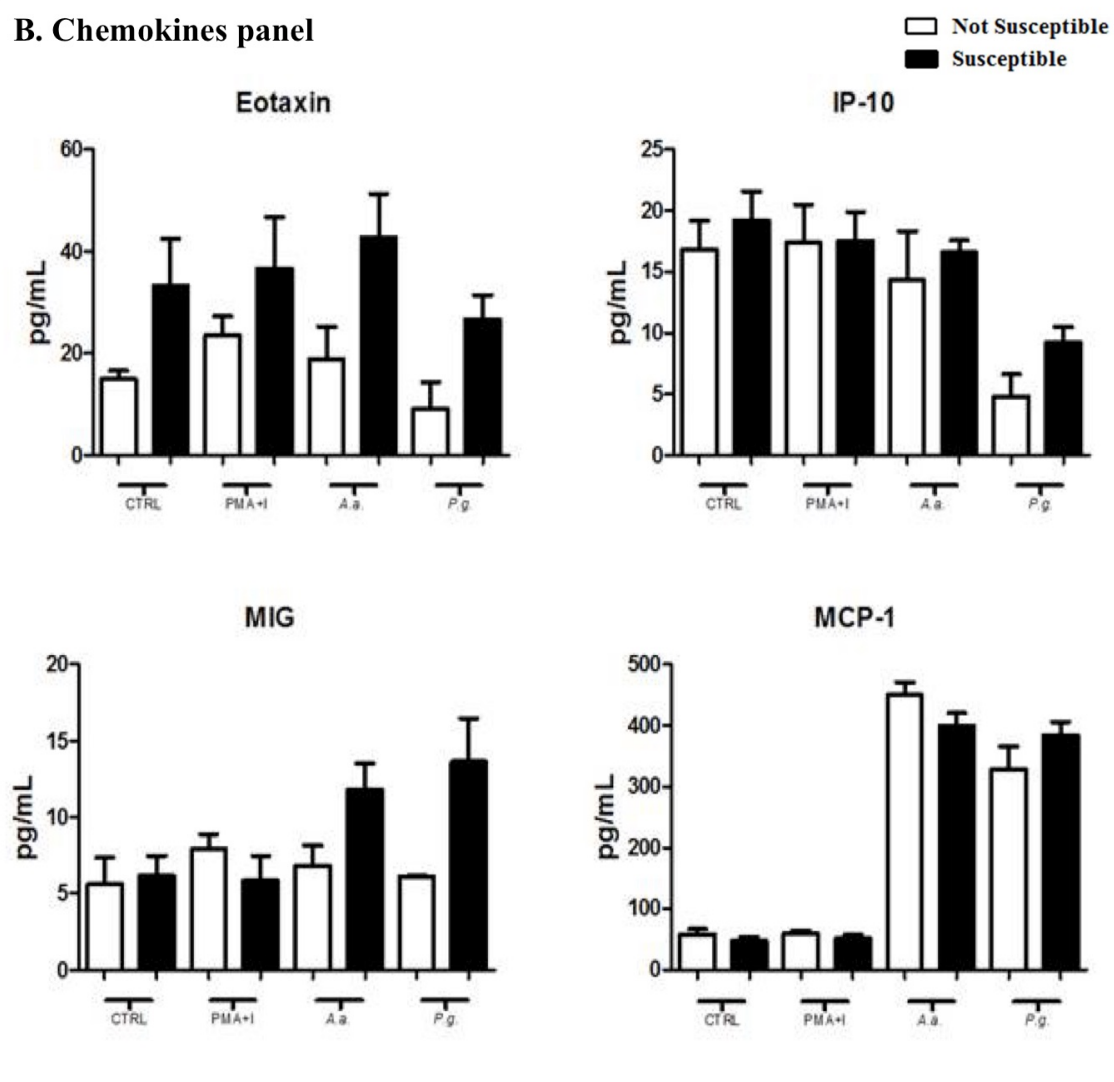
B. Th1/Th2 panel

Figure 4: A. Cytokine II Panel, B. Chemokine II Panel represented by the proteins analyzed by a multiplex assay in the whole blood of subjects carrying susceptible or not susceptible haplotypes after PMA+I, *A.a* and *P.g* stimulation. The concentration is expressed in pg/mL. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



B. Chemokines panel

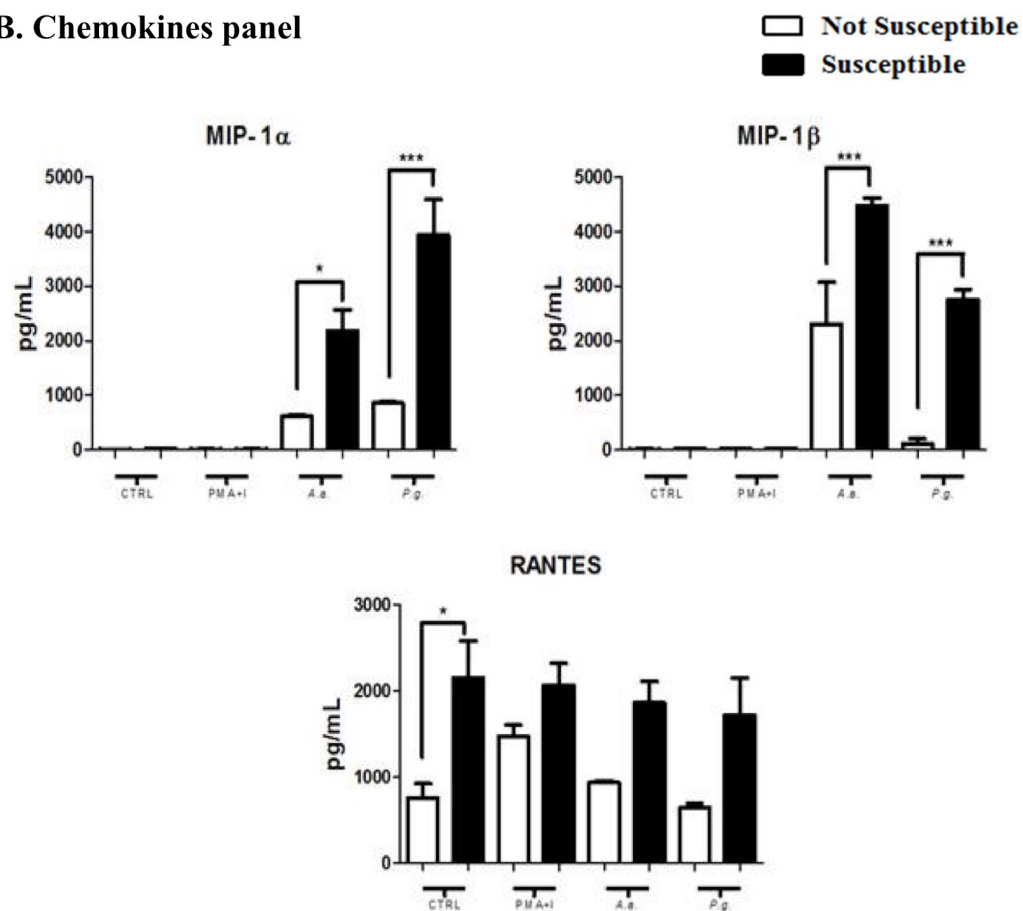
B. Chemokines panel

Figure 5: Number of migrating cells assessed in neutrophils cells from peripheral blood of individuals with the ATC/TTC *IL8* (susceptible) or ATT/TTC (Not susceptible) haplotype after IL-8 (positive control) or neutrophils supernatant obtained from a patient with the non-susceptibility haplotype to CP conditioned with *Aa* (experimental group) stimuli.

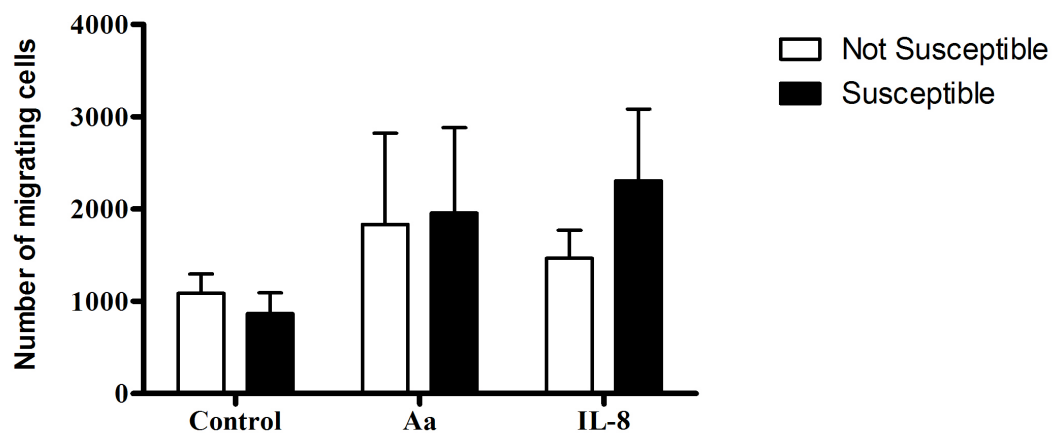
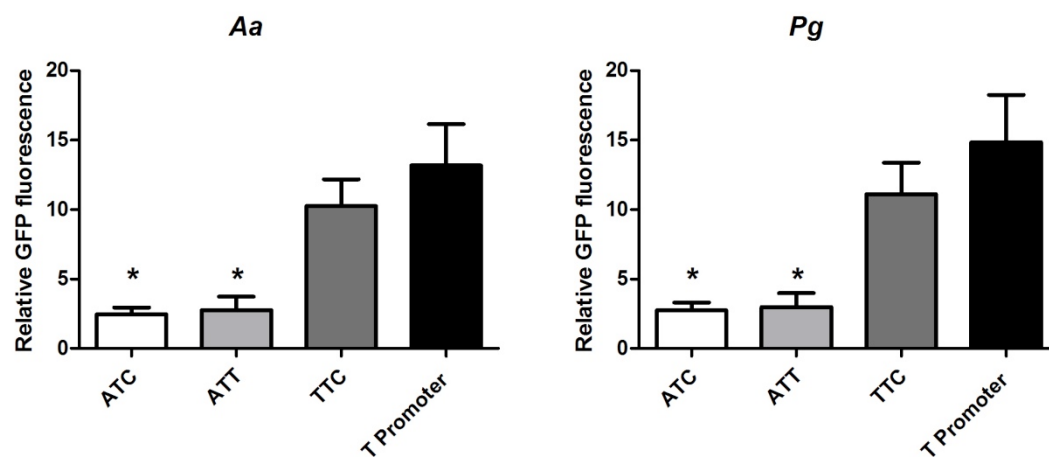


Figure 6: Transcriptional activity by GFP reporter gene of each IL8 haplotype construct in comparison with the construct containing only the allele T in promoter region of the *IL8* gene in which the T allele was present in the – 251 SNP. JM cells were stimulated with *Aa* or *Pg*. * $p < 0.05$ in regard to T promoter.



4 DISCUSSÃO GERAL

Nós investigamos pela primeira vez o papel funcional dos haplótipos no gene *IL8* previamente associado à susceptibilidade a DP⁸⁰ na resposta imune mediada por neutrófilos, linfócitos e monócitos. As células imunes foram isoladas de indivíduos portadores dos diferentes haplótipos e desafiadas pelos periodontopatógenos *Aa* e *Pg* ou pela associação do PMA + Ionomicina, considerado um estímulo inflamatório potente, policlonal e não específico⁵. Neutrófilos, linfócitos e monócitos dos doadores foram utilizados nesta abordagem experimental com base em seu papel crucial na resposta imune inata mediada por neutrófilos e monócitos e na adaptativa pelos linfócitos. Além disso, os estímulos utilizando co-cultura com *Pg* e *Aa* foram realizados devido ao fato de que esses patógenos periodontais são importantes para o estabelecimento e progressão da doença periodontal, colonizando as superfícies dos dentes e o epitélio interno do sulco gengival⁹⁰.

A avaliação dos perfis das células imunes avaliados por citometria de fluxo demonstrou que pacientes portadores do haplótipo suscetível apresentaram níveis significativamente maiores do fenótipo Th1 e M1 após estimulação com PMA + Ionomicina e *Pg* para Th1 e somente com *Pg* para M1. Esta maior ativação da via clássica M1 observada em indivíduos suscetíveis está relacionada à produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF- α e IL-12, que por sua vez, conduz a resposta aos linfócitos Th1. Por outro lado, os macrófagos ativados para via alternativa (M2) induzem a produção de citocinas reguladoras, como a IL-10 e conduzem a uma resposta Th2⁶⁹. É possível notar, apesar de sem diferença estatística, que os macrófagos pertencentes a indivíduos com o haplótipo associado a não susceptibilidade a DP, após a estimulação por *Pg*, apresentaram uma tendência para uma maior diferenciação

fenotípica para M2 em contraste com o fenótipo M1. Estes resultados indicaram que, uma vez que os portadores do haplótipo suscetível apresentaram maior ativação de macrófagos M1, isso pode contribuir para a iniciação e manutenção de um estado pró-inflamatório durante periodontite crônica nesses indivíduos.

Além disso, os resultados de polarização mais significativos foram encontrados em direção a Th1 para portadores do haplótipo suscetível após a realização de estímulos inflamatórios e com *Pg*. Sabe-se que o linfócito Th1 produz citocinas pró-inflamatórias IL-2, IFN- γ e TNF- α ⁶⁸. A polarização para Th2 também foi significativamente maior nos portadores do haplótipo suscetível após a estimulação com *Aa*. Embora as células Th2 estejam associadas à imunidade humoral com propriedades anti-inflamatórias ⁷², as citocinas Th2 predominantes poderiam estar envolvidas na destruição tecidual através da ativação policlonal das células B, resultando na elevação da regulação da IL-1 e menor resposta específica aos anticorpos ⁸⁶.

Ademais, houve maior polarização em relação ao Th17 para portadores do haplótipo suscetível após a estimulação com *Pg*. As células pró-inflamatórias Th17 desempenham um papel crítico na inflamação e em várias doenças auto-imunes ⁷⁷. Por outro lado, os portadores do haplótipo não suscetível apresentaram maior polarização em direção a Treg após estimulação com PMA + Ionomicina sugerindo uma resposta atenuada ⁴⁰ aos estímulos nesses indivíduos que pode impedir a destruição tecidual causada pelas respostas inflamatórias excessivas durante a DP.

A influência de ambos os haplótipos na expressão de mediadores imunológicos pelos neutrófilos, linfócitos e monócitos também foi investigada neste estudo. Os resultados mostraram que os indivíduos portadores do haplótipo suscetível apresentaram maior expressão de *IL8* mRNA pelas células imunes estimuladas pelos

periodontopatógenos indicando que essas variações genéticas são funcionais e aumentam a atividade transcricional do gene *IL8* nas células investigadas. Os níveis de IL-8 em sangue total também foram significativamente maiores em células de indivíduos com o haplótipo suscetível após estimulação com *Aa* e *Pg*, sugerindo modulação de toda a resposta imune por essas variações genéticas. Ademais, foram observados níveis mais elevados de mediadores inflamatórios associados à progressão da periodontite, incluindo TNF- α (mRNA e proteína), IL-1 β , IL-2R e IFN- γ (proteína), na resposta imune de indivíduos portadores do haplótipo suscetível após estímulos com os periodontopatógenos. Estes resultados reforçam a ocorrência de uma resposta inflamatória acentuada e maior gravidade da periodontite em indivíduos com haplótipo de suscetibilidade. Esses resultados corroboram com os achados de um estudo clínico prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa que mostrou que a destruição periodontal pode ocorrer em indivíduos portadores do haplótipo suscetível com menor desafio microbiano em comparação com pacientes não suscetíveis ³³.

A produção de quimiocinas relacionadas à coordenação das respostas do sistema imunológico e o desenvolvimento de células B e T ¹⁰⁸ também foram investigadas neste estudo. No que diz respeito à MIP-1 α e MIP-1 β , valores significativamente maiores foram demonstrados em indivíduos com haplótipo susceptível após o estímulo com *Aa* e *Pg*. Essas quimiocinas exibem amplas atividades biológicas sobrepostas, atuando como potentes fatores quimiotáticos/ativadores para monócitos, macrófagos, células assassinas naturais (NK) e células dendríticas imaturas ^{6, 75}. Além disso, essas citocinas servem como quimioatraentes para Th1, mas não para células Th2 o que reforçam seu caráter pró-inflamatório ⁸⁹. Da mesma forma, níveis mais elevados de RANTES, uma quimiocina eficiente para células Th1 (mas não para células Th2) (24), também foram

observados em indivíduos suscetíveis. Portanto, esses resultados reforçam que o haplótipo de susceptibilidade está associado a um perfil inflamatório exacerbado.

Neste estudo também foi observado maior porcentagem de células que fagocitaram *Aa* e *Pg* para indivíduos não suscetíveis, sugerindo maior capacidade de eliminar o patógeno e promover a efetiva resolução da inflamação em indivíduos não suscetíveis. Potencialmente, a redução na capacidade do hospedeiro para controlar a infecção em indivíduos suscetíveis impulsiona a resposta a um padrão mais crônico, o que pode levar à persistência da doença nesses pacientes ⁴. Além disso, houve um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos macrófagos, após a estimulação com *Pg* (mas não estatisticamente diferente) no grupo de pacientes portadores do haplótipo associado à susceptibilidade. Sabe-se que os níveis excessivos de ROS exercem efeitos citotóxicos ²⁷, causam danos oxidativos às proteínas e ao DNA ¹⁰³, interferem no crescimento celular e na progressão do ciclo celular ¹⁴ e induzem apoptose ¹⁰⁵ de fibroblastos gengivais. Portanto, a maior porcentagem de células produtoras de ROS observadas em indivíduos com haplótipo suscetível pode sugerir uma indução direta de dano tecidual periodontal nesses pacientes através da alta produção de ROS.

Em relação à migração de linfócitos, não foram encontradas diferenças entre os pacientes portadores do haplótipo suscetível e não suscetível, sugerindo que esses haplótipos no gene *IL8* não interferem na capacidade de migração dos linfócitos. Por outro lado, o aumento na migração de neutrófilos, sem diferenças estatísticas, pode ser observado para o grupo suscetível após a estimulação com IL-8, reforçando o perfil inflamatório exacerbado associado ao haplótipo suscetível. Embora os neutrófilos possam minimizar os efeitos destrutivos do desafio das bactérias ²⁵, esta célula também foi associada ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e

TNF- α no ambiente periodontal mediando a destruição do tecido periodontal através do estímulo a reabsorção óssea ⁹⁹.

A análise funcional da influência relativa de cada haplótipo específico (ATT, ATC e TTC) utilizando a expressão do gene repórter GFP mostrou uma maior expressão de GFP na presença do alelo T na posição -251 da região promotora (sequência selvagem) em comparação com os haplótipos ATT e ATC. Todavia, não houve diferença na expressão de GFP entre o alelo T no promotor e o haplótipo TTC sugerindo que os polimorfismos na região de intron (no caso, a segunda e terceira posição do haplótipo) não interferem na expressão do gene *IL8*. Além disso, a presença do alelo A na região promotora -251 reduziu a expressão de GFP após os estímulos (como se pode observar pelos haplótipos), mas não houve diferença entre os polimorfismos ATT e ATC. Dessa forma sugere-se que a presença do alelo T na região promotora é a condição mais relevante no direcionamento da atividade transcricional do promotor de *IL8*. Um estudo anterior desenvolvido por Ahn et. al. 2008 ¹ por meio do ensaio utilizando o gene repórter luciferase, avaliou a atividade transcricional do alelo T ou A na região promotora do gene *IL8* em células HEK transfectadas com plasmídeos contendo tais alelos. Foi observada maior atividade da luciferase em células transfectadas com o plasmídeo contendo o alelo T, sugerindo que o alelo T na região promotora pode aumentar a transcrição do gene *IL8* em comparação com o alelo A.

Por outro lado, em um estudo realizado por nosso grupo em parceria com a Universidade da Pensilvânia em que a investigação da funcionalidade dos haplótipos no gene *IL8* foi realizada por meio do sistema CRISPR-Cas9-HRD, verificamos que células de linhagem editadas com o haplótipo (S) ATC/TTC no gene *IL8* previamente associado com suscetibilidade à DP aumentaram o recrutamento de neutrófilos ao produzir mais IL-8 quando submetidas aos mesmos estímulos que as células que

carregavam o haplótipo ATT/TTC que não tinha sido previamente associado à DP. Assim, a funcionalidade de haplótipos utilizando o sistema CRISPR-Cas9-HRD demonstrou resultados mais compatíveis com os obtidos das células imunes de pacientes.

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-Suguimoto 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-1 β and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Periodontal 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- α 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 α -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- κ B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol*. 1994; 153(1): 153-64.
58. Kunsch C, Rosen CA. NF- κ 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, *Capnocytophaga* 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.

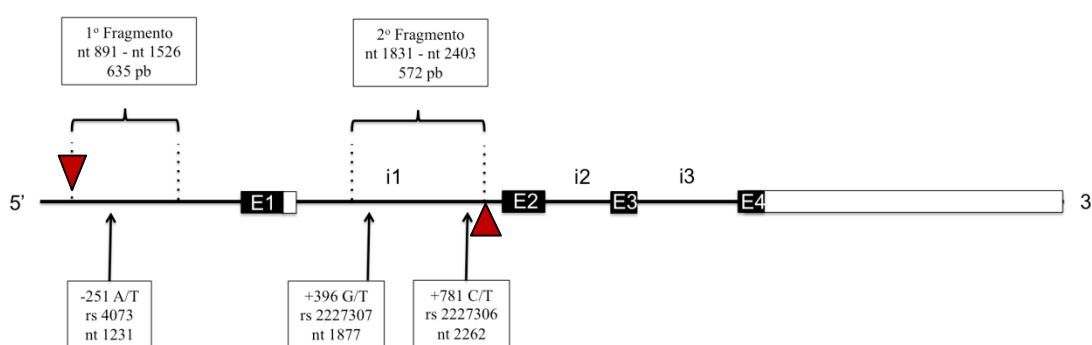
APÊNDICE A

METODOLOGIA DETALHADA

1 Procedimentos para verificação dos haplótipos dos polimorfismos do gene *IL8*

Para verificar os genótipos/haplótipos dos pacientes foram realizadas amplificações por PCR para regiões específicas do gene *IL8* (Figura A1) e em seguida os fragmentos foram purificados e encaminhados para sequenciamento. Assim, os alelos verificados nos estudos anteriores por *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foram sequenciados. Para isso, o DNA que foi previamente obtido de células epiteliais da mucosa bucal por meio de bochecho com solução de glicose a 3% por 2 min e extraído com solventes orgânicos. O DNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro UV para microvolumes (Nanovue Plus, GE Healthsciences) e sua pureza foi estimada pela razão OD 260/280.

Figura A1 - Esquema do gene *IL8* com destaque para a amplificação de regiões que contém os polimorfismos -251 (A/T), +396 (G/T) e +781 (C/T).



Fonte: Retirado de Finoti³⁰, p.¹²³

Em seguida a amplificação do 1º Fragmento do gene *IL8*, que compreende o polimorfismo -251 (A/T), rs4073, foi realizada utilizando os seguintes primers:

“Forward” – 5’ GTG GAA CTG ATT TCT ATG TGA A 3’; “Reverse” – 5’ TGT GCC TTA TGG AGT GCT C 3’

As condições da reação de PCR gerando um amplicon de 635 pares de base (pb) foram: Volume final da reação de 20uL. Tampão 10xPCR; 200 µM dNTP, 0,20 µM cada primer, 1,5 mM MgSO₄, 1,75U PlatinumTM *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen; Catalog Number: 10966018), 0,5x PCREnhancer, 200 ng de DNA. Foi realizada uma desnaturação inicial a 95°C por 3,2 minutos, seguida de 34 ciclos sendo: desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos, e extensão a 68°C por 2 minutos. Também foi realizada uma etapa de extensão final a 68°C por 8 minutos.

Para a amplificação do 2º Fragmento do gene *IL8*, que compreende o polimorfismo na base +396 G/T e o polimorfismo na base +781 C/T, foram utilizados os seguintes primers:

“Forward” – 5’ TAA AGG TTT GAT CAA TAT AGA 3’; “Reverse” – 5’ CTT CCT TCT AAT TCC AAT TCC AAT ATG 3’

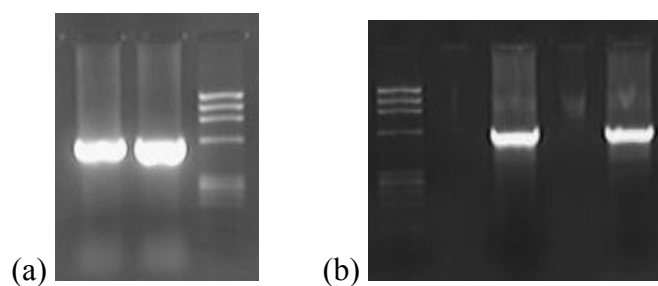
As condições da reação de PCR gerando um amplicon de 572pb foram: Volume final da reação de 20uL. Tampão 10xPCR; 200 µM dNTP, 0,30 µM cada primer, 1,5 mM MgSO₄, 1,7U PlatinumTM *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen; Catalog Number: 10966018), 0,5x PCREnhancer, 200 ng de DNA. Foi realizada uma desnaturação Inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos sendo: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 49°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto. Também foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos das reações de PCR foram verificados em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio. Os géis foram fotografados com o fotodocumentador GDS 8000 System (UVP, Upland, CA, USA). Os fragmentos de interesse foram excisados do gel para purificação com o kit PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen; Catalog number: K310001), seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras foram submetidas à quantificação de DNA (A260) e análise da pureza (A260/280) com auxílio do espectrofotômetro NanoView®, e encaminhados (mínimo de 20 ng/uL) para sequenciamento no Serviço de Sequenciamento de DNA, do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP).

2 Confirmação dos haplótipos do gene *IL8* de cada paciente

Após reação de PCR para amplificação dos fragmentos (Figura A2), os produtos da reação foram purificados e submetidos à quantificação de DNA apresentando um valor mínimo de 20 ng/uL necessário para o sequenciamento. As sequências de DNA (Figura A3) foram então avaliadas na base de dados NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que identificou o fragmento como pertencente ao gene *Homo sapiens IL8* (Figura A4). As sequências do gene *IL8* e do fragmento sequenciado foram então alinhadas no programa BioEdit, mostrando a equivalência entre ambas (Figura A5).

Figura A2 - Representação do PCR do primeiro fragmento com tamanho de 635pb (a) e do segundo fragmento com 572 pb (b)



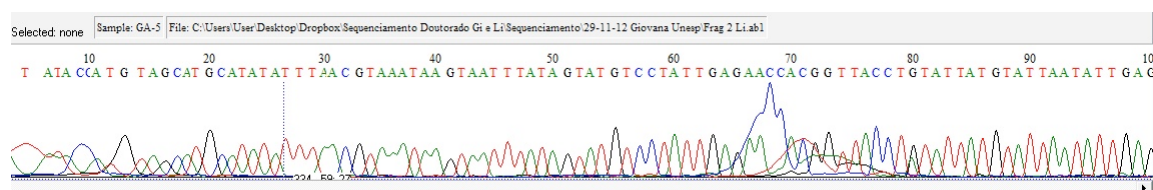
Fonte: Elaboração Própria

Figura A3 - Sequenciamento do 1º (a) e 2º (b) fragmentos de DNA de gene *IL8*

(a)



(b)



Fonte: Elaboração Própria

Figura A4 - Reconhecimento da sequência dos fragmentos de DNA pelo NCBI Blast, *Homo sapiens IL8* (a) 1º Fragmento / (b) 2º Fragmento.

(a)

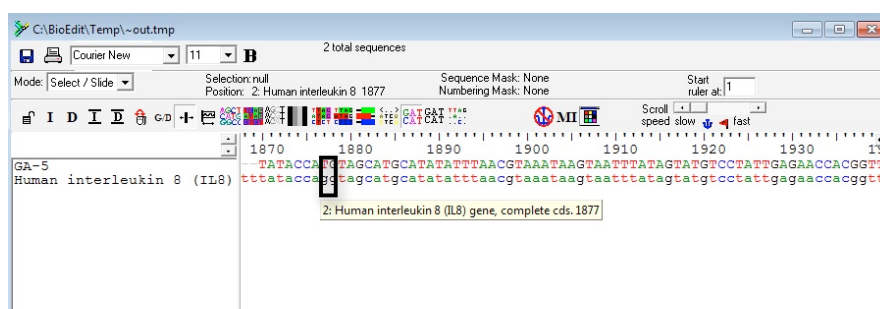
Descriptions		NCBI Blast:Nucleotide Sequence (196 letters)				
Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer P PubChem BioAssay						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NG_029889.1	Homo sapiens interleukin 8 (IL8), RefSeqGene on chromosome 4	315	315	93%	4e-83	97%

(b)

Descriptions		NCBI Blast:Nucleotide Sequence (338 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
NG_029889.1	Homo sapiens interleukin 8 (IL8), RefSeqGene on chromosome 4	606	606	99%	1e-170	99%

Fonte: Elaboração Própria

Figura A5 - Alinhamento das sequencias do gene *IL8* e do 2º fragmento sequenciado no programa BioEdit, mostrando a equivalência entre ambas. Na figura, o nucleotídeo 1877, que compreende o polimorfismo +396 (G/T), mostrou uma alteração de bases quando comparado o gene com o fragmento sequenciado.



Fonte: Elaboração Própria

Com os resultados obtidos da genotipagem (tamanho de cada fragmento) e do sequenciamento, verificamos que a metodologia empregada foi eficiente para comprovar que cada paciente selecionado apresenta o referido haplótipo para o gene *IL8*

3 Descrição da Amostra

Após aprovação deste estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOAr – UNESP (CAAE 18527813.7.0000.5416), foram contatados 12 indivíduos acima de 23 anos, não importando o gênero ao qual pertencem nem a etnia, que possuísem o haplótipo no gene *IL8* que confere suscetibilidade à DP (S): ATC/TTC (n=6) e o haplótipo que não confere suscetibilidade à DP (NS): ATT/TTC (n=6). O tamanho da amostra (6 indivíduos) para cada haplótipo foi obtido através da realização do 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 foi realizada com o sangue doado pelos pacientes que possuísem os haplótipos de interesse no gene *IL8*.

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 *IL8* na resposta imune. De cada voluntário foi coletado o sangue periférico para separação de linfócitos T, monócitos e neutrófilos. Foram realizados experimentos em que tais células dos pacientes com haplótipos de suscetibilidade receberam estímulos com bactérias Gram-negativas associadas à doença periodontal (*P.gingivalis*, cepa ATCC 33277.; *A.actinomycetemcomitans*, cepa JP2) e com os controles positivos (phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/ionomicina e Interleucina (IL) 1 beta). Considerando a interação microbiota/hospedeiro, foi avaliado se esses haplótipos influenciam na expressão gênica por RT-qPCR, síntese proteica por multiplex (proteínas secretadas) e por 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 não-suscetibilidade. Os estímulos, conforme descrição na Tabela A1, foram realizados para os diferentes tipos celulares.

Tabela A1 - Experimentos e estímulos (período/concentrações) realizados para linfócitos T, monócitos e neutrófilos.

Experimento	Nº Células (por poço)	Período Estímulo	Estímulos (concentração)
RT-qPCR (RNAm)	5×10^5	4 h	- Controle negativo - PMA/ ionomicina (50 / 500 ng/ml) - IL-1 beta (5 ng/ml) - Co-cultura <i>P.gingivalis</i> - Co-cultura <i>A.actinomycetemcomitans</i>
Citometria de Fluxo (proteínas intracelulares)	1×10^6	72 h	
Imunoensaio Multiplex (proteínas secretadas)	1×10^6	12 h	

Fonte: Elaboração própria

4 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* 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 CO₂ 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 (GasPakTM 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 CO₂ dada pelo envelope GasPakTM. Após este intervalo de tempo, a concentração da suspensão bacteriana foi ajustada por mensuração em espectrofotômetro à $\text{DO}_{495 \text{ nm}}$ para $\sim 0,2$; seguindo-se à diluição 1:40 em caldo TSB e incubação por 7 horas.

5 Coleta e separação das células do sangue periférico

O sangue periférico doado pelos voluntários 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, e sobre este 6,0 mL de sangue periférico. A seguir os tubos foram submetidos à centrifugação (850 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.

Após a separação inicial dos neutrófilos das 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, ressuspendidas 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 (Invitrogen Corp.). 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 então ressuspendidas 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 ressuspendidas 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.

6 Avaliação da expressão gênica (RT-qPCR)

Os estímulos realizados foram os 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 três 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)
GAPDH	Hs02758991_g1	NM_002046.4	7-8	93
IL-4	Hs00174122_m1	NM_000589.2	3-4	70
TNF- α	Hs01113624_g1	NM_000594.2	2 - 3	143
IL-12a	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 500 ng de RNA total por meio de primers *random hexamers* e moloneyleukemia vírus reverse transcriptase, segundo as instruções do fornecedor do kit (High CapacityRT kit, AppliedBiosystems).

A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando conjuntos de primers e sondas pré-desenhados (Gene expression assays, Applied Biosystems) para detecção dos genes-alvo (*IL4*, *IL8*, *TNFA*, *IL12a*) e do gene constitutivo (*GAPDH*) por meio do

sistema TaqMan (TaqMan Universal PCR Master Mix, AppliedBiosystems). A reação foi realizada a partir de: 10µL de *TaqMan Fast Advanced Master Mix 2x*, 1,0µL de primers, 7,0µL de água e 2,0µL de cDNA, sendo que no controle negativo, será adicionado 2,0 µL 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.

7 Avaliação da expressão proteica (Multiplex)

Para avaliação abrangente da influência dos diferentes haplótipos no gene *IL8* 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 A1 por 12 h. Bactérias vivas foram utilizadas na proporção de 100:1 (Bactéria:Célula). Ao final dos períodos experimentais, as culturas foram centrifugadas (500g, 5 min à 4°C) e o sobrenadante aliquoteado 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.

8 Avaliação do perfil fenotípico da resposta imune (Citometria de Fluxo)

Alíquotas das amostras de sangue total para este experimento foram coletadas e preparadas como descrito no item 6. As amostras de sangue total foram diluídas 1:1 em meio de cultura RPMI 1640 contendo 20% de FBS inativado por calor. Foram realizados estímulos com *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na proporção de 100:1 (microrganismos inativados/célula) por 72 horas ou somente meio de cultura (controle). As bactérias foram inativadas por calor mantidas em banho-maria por 1 hora a 65°C. Nas últimas 4 horas do período experimental foi acrescentado o inibidor de transporte protéico monensina (Golgi-Stop, BD Biosciences) e também foram realizados estímulos com PMA + Ionomicina (50

ng/mL de PMA e mais 500 ng/mL de ionomycin calcium salt (I)(Sigma)). 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 FACSUIE (BD Biosciences).

9 Ensaio de Migração de Linfócitos e Neutrófilos

Neutrófilos e linfócitos humanos foram isolados de três pacientes para cada haplótipo investigado nesse estudo seguindo o protocolo experimental descrito no item 5. Para o ensaio de migração dos *linfócitos*, o ensaio foi conduzido em câmaras de Transwell® com membrana de polycarbonato (poros de 8,0 µm de diâmetro; Corning Incorporated; EUA) em placas de cultura de células com 12 poços. Os linfócitos

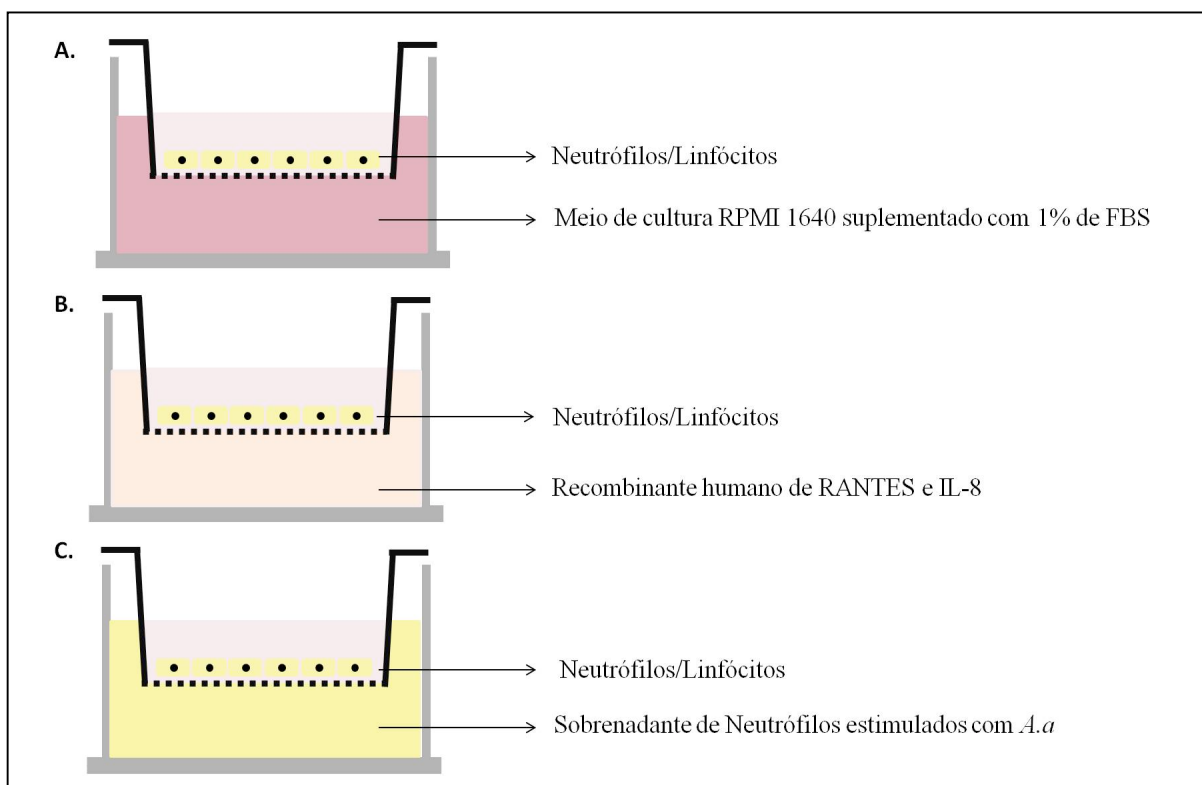
recentemente isolados (1×10^6 célula/poço) de três pacientes para cada haplótipo foram submetidos a três condições experimentais por 8 horas: 1) Controle Negativo, linfócitos foram adicionados às câmaras superiores do Transwell®, sendo que no compartimento inferior foi adicionado meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 1% de FBS sem antibiótico; 2) Controle Positivo, no compartimento inferior foi adicionado ao meio de cultura 10ng/ul do recombinante humano de RANTES (R&D Systems, Minneapolis, MN); 3) No compartimento inferior foi adicionado sobrenadante de neutrófilos (obtidos de um paciente com o haplótipo de não-suscetibilidade à DP condicionados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na proporção de 10:1 [microrganismos inativados/célula]) por 6 horas) que foi utilizado como estímulo para atração dos linfócitos dos pacientes com os diferentes haplótipos (presentes no compartimento superior) (Figura A6).

Para o ensaio de migração dos *neutrófilos*, o ensaio foi conduzido em câmaras de Transwell® com membrana de policarbonato (poros de 3,0 μm de diâmetro; Corning Incorporated; EUA) em placas de cultura de células com 12 poços. Os neutrófilos recentemente isolados (1×10^6 célula/poço) de três pacientes para cada haplótipo foram submetidos a três condições experimentais por 30 minutos: 1) Controle Negativo, os neutrófilos foram adicionados às câmaras superiores do Transwell®, sendo que no compartimento inferior foi adicionado meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 1% de FBS sem antibiótico; 2) Controle Positivo, no compartimento inferior foi adicionado ao meio de cultura 100ng/ul do recombinante humano de IL-8 (R&D Systems, Minneapolis, MN); 3) No compartimento inferior foi adicionado sobrenadante de neutrófilos (obtidos de um paciente com o haplótipo de não-suscetibilidade à DP condicionados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na proporção de 10:1 [microrganismos inativados/célula]) por 6 horas) que foi utilizado

como estímulo para atração dos neutrófilos dos pacientes com os diferentes haplótipos (presentes no compartimento superior) (Figura A6).

Após os respectivos períodos de incubação de cada experimento, as membranas foram coradas com DAPI (1µg/mL) e o número de linfócitos ou neutrófilos migrados para a câmara inferior foram contados em cinco campos utilizando um microscópio de luz invertida (aumento 20X).

Figura A6 - Representação esquemática do Ensaio de Migração de Linfócitos e Neutrófilos. A) Controle Negativo; B) Controle Positivo; C) Sobrenadante de neutrófilos obtidos de um paciente com o haplótipo de não-suscetibilidade à DP condicionados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) por 6 horas.



Fonte: Elaboração própria

10 Ensaio de Fagocitose de Macrófagos

Monócitos humanos foram isolados de três pacientes para cada haplótipo investigado nesse estudo seguindo o protocolo experimental descrito no item 5. Os monócitos recém-isolados foram plaqueados (2×10^5 células/poço) em placas de cultura de células com 96 poços com meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS a 37°C em 5% de CO₂. A diferenciação de monócitos / macrófagos foi induzida com PMA (Sigma-Aldrich) na concentração final de 10 nM durante 24 horas¹⁵. Após 24 horas, os macrófagos foram estimulados durante 2 horas com *Pg* e *Aa* marcados com 10 µM de CFSE em PBS contendo 0,1% de BSA durante 10 minutos a 37°C. As células foram incubadas com 1 µl de anticorpo bloqueador do receptor Fc (BD humano Fc Block™, BD Biosciences) durante 15 min. Em seguida, as células foram marcadas com CD11b/PeCy7 (marcador de macrófagos, BD Biosciences) durante 30 minutos no escuro. Os dados foram adquiridos utilizando citômetro de fluxo (FACSVerse, BD Biosciences) e a análise efetuada com o software FACSUIE (BD Biosciences).

11 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

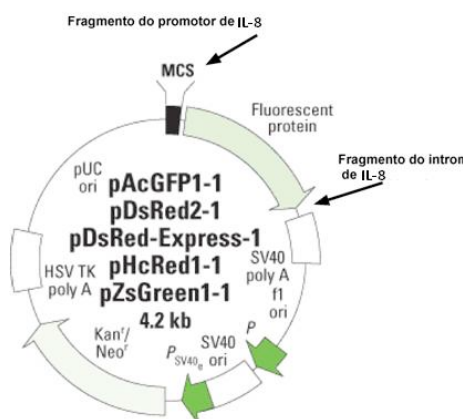
Após 24 horas da diferenciação de monócitos / macrófagos como descrito no item 10, os macrófagos foram incubados com carboxy-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (carboxy-H₂DCFDA); #C400, Molecular Probes, Eugene, OR) durante 2 horas a 37°C. Em seguida, os macrófagos foram estimulados com *Pg* e *Aa* durante 20 minutos a 37°C. Os dados foram adquiridos utilizando citômetro de fluxo (FACSVerse, BD Biosciences) e a análise efetuada com o software FACSUIE (BD Biosciences).

12 Estudos utilizando gene-repórter

12.1 Síntese dos construtos

Os construtos utilizados foram obtidos comercialmente na empresa GenScript. Os vetores plasmidiais foram construídos de maneira que a expressão do gene-repórter GFP (*green fluorescent protein*) estivesse sob o controle do promotor proximal de *IL8* (fragmento de 1 kb: -950 até +50) (Figura A7).

Figura A7 - Representação esquemática do mapa do plasmídeo (pAcGFP1-1 - Clontech) de gene-repórter (proteína fluorescente GFP). São indicadas as posições em que foram inseridas as sequências correspondentes aos fragmentos do promotor e intron do gene *IL8*.



Fonte: Adaptada do artigo de Han et al.⁴², p.³⁰⁵

Como também faz parte dos referidos haplótipos, polimorfismos existentes na região do intron 1 da sequência do gene *IL8* (820 pb) depositado na base de dados do NIH/NCBI (GenBank accession numbers # M28130.1 e M23442.1, respectivamente) também foram avaliados. Estas sequências foram sintetizadas juntamente com a sequência do vetor repórter de GFP (pAcGFP1-1, Clontech Lab. Inc) e a sequência correspondente ao intron foi inserida imediatamente após a sequência codificadora do gene-repórter do vetor e antes do sítio poli-A (Figura A7). Assim, obtivemos um

constructo para avaliar a influência do(s) polimorfismo(s) na região promotora e/ou intrônica na expressão dos genes.

12.2 Mutações Sítio-dirigidas Constructos *IL8*

A partir do constructo ATC obtido por síntese pela GenScript foram realizadas alterações na sua sequência (por mutagênese sítio-dirigida) correspondentes aos diferentes haplótipos, conforme descrito na Tabela A3. Para realizarmos as 2 mutações sítios-dirigidas utilizamos primers desenhados por meio do programa SnapGene Viewer. Também utilizamos primers específicos para realizar os sequenciamentos necessários para identificação dos plasmídeos mutados (Tabela A4).

Tabela A3 - Primers utilizados para as mutações sítio-dirigidas que foram realizadas a partir do constructo sintetizado e para identificação destes por sequenciamento

Haplótipos <i>IL8</i>	Mutação	Primers desenhados (sentido 5' – 3')
ATC	Selvagem (constructo sintetizado)	-
<u>TTC</u>	A1277T*	<u>Forward:</u> ctagaaataaaaaagcatacaTttgataattcaccaaattgtg
		<u>Reverse:</u> cacaatttggtgaattatcaaAtgtatgctttttatttctag
ATT	C2948T*	<u>Forward:</u> ctctaactcttatataggaagtTgttcaatgtgtcagttatgac
		<u>Reverse:</u> gtcataactgacaacattgaacAacttcctatataagagttagag

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

Fonte: Elaboração própria

Para cada mutagênese sítio-dirigida em cada constructo de cada gene, a reação em cadeia da polimerase (PCR) 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.

12.3 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.-quantidade suficiente para) 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 ressuspendido em 100 μ L do sobrenadante que foi plaqueado em meio LB contendo Kanamicina (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, 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.

12.4 Preparação plasmidial - kit Qiaprep Spin Miniprep

A partir dos inóculos líquidos, foi realizada a preparação dos diferentes plasmídeos por meio do Kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen), seguindo seu protocolo. Um volume de 3 mL de cultura foi decantado em microcentrífuga (Eppendorf 5415D) a

14.000 g por 1 min. O pellet foi ressuspensionado em 250 µL de tampão P1 contendo RNase e depois foram adicionados 250 µL de tampão de lise P2. O microtubo foi invertido por 4 a 6 vezes e foram adicionados 350 µL 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 centrifuga, 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 os oligonucleotídeos conforme a Tabela A4.

Tabela A4 - Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para as reações de sequenciamento.

Mutação	Primers utilizados (sentido 5' – 3')
A1277T*	GATTGGCTGGCTTATCTTCACC
C2948T*	AAGGCAATTTCTATGCTGGAG

Fonte: Elaboração própria

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). 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.

12.5 Transfecção dos plasmídeos contendo os haplótipos *IL8*

Os vetores plasmidiais mutagenizados (constructos contendo os 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 do gene *IL8* foram avaliados pela expressão do gene repórter (GFP) 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 (1×10^7 cels/mL) são ressuspensas em tampão Buffer R (Kit Neon, InvitrogenCorp). Dessa suspensão, 100 µl foram transferidos para um novo microtubo e adicionada a concentração de 10 µg 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 (50 ng/mL de PMA mais 500 ng/mL de Ionomicina), IL-1b (5mg/mL) e *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na proporção de 10:1 (microrganismos inativados/célula) 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.

13. Análise Estatística

O software GraphPadPrism 6.0 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para análise estatística. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov para avaliar se esses se distribuíram de acordo com o teorema da distribuição central. Foi utilizado então o teste paramétrico ANOVA de comparação múltipla seguido pelo teste de Tukey em todas as análises. O nível de significância estatística estabelecido para todas as análises foi de 5% ($p < 0.05$).

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 22/09/2019.

(Diretos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 23 de Setembro de 2017.

SUZANE CRISTINA PIGOSSI