



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



LIVIA SERTORI FINOTI

**INVESTIGAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE HAPLÓTIPOS NO GENE
INTERLEUCINA 8 NO CONTEXTO DA PERIODONTITE CRÔNICA**

ARARAQUARA

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



LIVIA SERTORI FINOTI

INVESTIGAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE HAPLÓTIPOS NO GENE
***INTERLEUCINA 8* NO CONTEXTO DA PERIODONTITE CRÔNICA**

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

2015

Finoti, Livia Sertori

Investigação da funcionalidade de haplótipos no gene interleucina 8
no contexto da periodontite crônica / Livia Sertori Finoti .--
Araraquara: [s.n.], 2016.
148 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra Raquel Mantunelli Caminaga

1. Polimorfismo genético 2. Expressão gênica 3. Sistema
imunológico 4. Interleucina-8 5. Metanálise I. Título

LIVIA SERTORI FINOTI

**INVESTIGAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE HAPLÓTIPOS NO GENE
INTERLEUCINA 8 NO CONTEXTO DA PERIODONTITE CRÔNICA**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORADO

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

2º Examinador: Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Junior

3º Examinador: Prof^ª. Dr^a. Karina Gonzales Silverio Ruiz

4º Examinador: Prof^ª. Dr^a. Daniela Leal Zandim Barcelos

5º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara, 15 de Dezembro de 2015.

LIVIA SERTORI FINOTI

Dados curriculares

Nascimento	20 de Fevereiro de 1987
Naturalidade	Campinas – SP
Filiação	Paulo Roberto Finoti Vera Lúcia Sertori Finoti
2005 - 2008	Curso de graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr Universidade Estadual Paulista – UNESP
2010 - 2012	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia Nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr Universidade Estadual Paulista – UNESP
2012 - 2015	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia Nível Doutorado Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr Universidade Estadual Paulista – UNESP

DEDICO ESTE TRABALHO...

À **Deus**. Sem Ele guiando meu caminho nada seria possível. Obrigada Meu Deus por me proporcionar a vida, minha família, meus amigos. Obrigada por não permitir que eu desacreditasse, que eu parasse perante os obstáculos. Por me dar forças pra lutar, e estar conquistando mais um sonho. Obrigada Senhor.

Ao meu pai, **Paulo Roberto Finoti** (*in memorian*). Meu amor. Meu companheiro de todas as horas. Meu PAI. Uma palavra de três letras com um som tão doce. Tão doce quanto os momentos inesquecíveis que vivemos, que compartilhamos. Tenho certeza que o céu brilha mais com a sua presença. Presença que foi tão intensa durante 20 anos em minha vida, que mesmo hoje, na ausência, consigo sentir você ao meu lado, me indicando o caminho certo, me dando conselhos, como sempre fazia.

À minha mãe, **Vera Lúcia Sertori Finoti**. A definição perfeita da palavra intensidade. Você meu amor, ama intensamente, vive intensamente, se dedica intensamente. E é SIM meu grande exemplo! Me inspiro na sua força, na sua raça, na sua luta incansável. Nada é impossível quando você põe a mão. Minha fada madrinha, meu alicerce, meu porto seguro. Eu te AMO tanto que você nem imagina! Obrigada por estar do meu lado em TODOS os momentos. Eu não seria absolutamente nada sem você ao meu lado!

Ao meu avô, **Walter Sertori** (*in memorian*). Aquele que sempre acreditou que eu conseguiria. Mesmo quando nem eu acreditava. Acreditou que eu terminaria a escola. Acreditou que eu passaria no vestibular. Acreditou que eu completaria a faculdade. Terminei a escola. Passei no vestibular. E via um brilho no olhar que jamais me esquecerei. Não estava presente nas últimas conquistas, mas a confiança era tamanha, que é indescritível a sensação de ter fechado os olhos no dia da formatura e na defesa do mestrado e lembrar claramente daquele brilho, daquela vibração. Obrigada Vô! O melhor avô que alguém poderia ter nesse mundo, eu tive!

À minha avó, **Wilma Zúniga Assencio Sertori** (*in memorian*). A mulher mais forte que eu conheci. Que fortaleza! Os grandes obstáculos da vida pareciam pequenos perante a senhora. Enfrentados com coragem, perseverança, alegria. Quanta alegria! Alegria contagiante, que atraía a todos. Admirável a minha bonequinha, que eu amo de coração. Obrigada pelos conselhos, pelo apoio incondicional!

Ao meu tio, **Walter Sertori Júnior**. Com quem convivo desde que nasci! Que me “paparicava” quando eu era criança. Me levava ao cinema, buscava minhas amigas, muitas vezes exercendo um papel de pai! Muito obrigada por me proteger, me defender, por confiar em mim! Tenha certeza sempre que é completamente recíproco e verdadeiro.

À **Ia** do meu coração. Que me protege, que por eu é protegida! Que me ensinou tanta coisa! Desde à montar um quebra cabeça até a ser fiel com as pessoas. Àquela que não consigo pensar em um só momento marcante que não estivesse presente, momentos felizes, momentos tristes. A sua “Pituca” precisa de você! E estará ao seu lado sempre.

DEDICO ESTE TRABALHO...

À **Deus**. Sem Ele guiando meu caminho nada seria possível. Obrigada Meu Deus por me proporcionar a vida, minha família, meus amigos. Obrigada por não permitir que eu desacreditasse, que eu parasse perante os obstáculos. Por me dar forças pra lutar, e estar conquistando mais um sonho. Obrigada Senhor.

Ao meu pai, **Paulo Roberto Finoti** (*in memorian*). Meu amor. Meu companheiro de todas as horas. Meu PAI. Uma palavra de três letras com um som tão doce. Tão doce quanto os momentos inesquecíveis que vivemos, que compartilhamos. Tenho certeza que o céu brilha mais com a sua presença. Presença que foi tão intensa durante 20 anos em minha vida, que mesmo hoje, na ausência, consigo sentir você ao meu lado, me indicando o caminho certo, me dando conselhos, como sempre fazia.

À minha mãe, **Vera Lúcia Sertori Finoti**. A definição perfeita da palavra intensidade. Você meu amor, ama intensamente, vive intensamente, se dedica intensamente. E é SIM meu grande exemplo! Me inspiro na sua força, na sua raça, na sua luta incansável. Nada é impossível quando você põe a mão. Minha fada madrinha, meu alicerce, meu porto seguro. Eu te AMO tanto que você nem imagina! Obrigada por estar do meu lado em TODOS os momentos. Eu não seria absolutamente nada sem você ao meu lado!

Ao meu avô, **Walter Sertori** (*in memorian*). Aquele que sempre acreditou que eu conseguiria. Mesmo quando nem eu acreditava. Acreditou que eu terminaria a escola. Acreditou que eu passaria no vestibular. Acreditou que eu completaria a faculdade. Terminei a escola. Passei no vestibular. E via um brilho no olhar que jamais me esquecerei. Não estava presente nas últimas conquistas, mas a confiança era tamanha, que é indescritível a sensação de ter fechado os olhos no dia da formatura e na defesa do mestrado e lembrar claramente daquele brilho, daquela vibração. Obrigada Vô! O melhor avô que alguém poderia ter nesse mundo, eu tive!

À minha avó, **Wilma Zúniga Assencio Sertori** (*in memoriam*). A mulher mais forte que eu conheci. Que fortaleza! Os grandes obstáculos da vida pareciam pequenos perante a senhora. Enfrentados com coragem, perseverança, alegria. Quanta alegria! Alegria contagiante, que atraía a todos. Admirável a minha bonequinha, que eu amo de coração. Obrigada pelos conselhos, pelo apoio incondicional!

Ao meu tio, **Walter Sertori Júnior**. Com quem convivo desde que nasci! Que me “paparicava” quando eu era criança. Me levava ao cinema, buscava minhas amigas, muitas vezes exercendo um papel de pai! Muito obrigada por me proteger, me defender, por confiar em mim! Tenha certeza sempre que é completamente recíproco e verdadeiro.

À **Ia** do meu coração. Que me protege, que por eu é protegida! Que me ensinou tanta coisa! Desde à montar um quebra cabeça até a ser fiel com as pessoas. Àquela que não consigo pensar em um só momento marcante que não estivesse presente, momentos felizes, momentos tristes. A sua “Pituca” precisa de você! E estará ao seu lado sempre.

AGRADEÇO ESPECIALMENTE...

À minha orientadora, **Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga**, por toda confiança depositada em mim desde o começo. Pelos ensinamentos passados, como professora, orientadora, e pessoa. Na minha cabeça Raquel e admiração são sinônimos. Admiro de coração seu trabalho, sua energia, e sua busca constante pra melhorar tudo o que for possível! Obrigada por me permitir fazer parte do seu convívio.

Ao **Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior**, por todo o apoio no desenvolvimento dos trabalhos, dedicação e competência em suas atividades.

Ao **Dr. Denis Kinane**, por ter me aceitado prontamente em seu laboratório e por todo aprendizado oferecido. E ao **Dr. Manjunatha Benakanakere**, por toda atenção, disponibilidade e conhecimento compartilhado desde a minha chegada na Filadélfia.

À minha grande amiga **Suzane Pigossi**, que é a irmã que Deus me deu. Que me escuta, me dá conselhos, me ensina. Está sempre ao meu lado, me apoiando, mostrando o caminho certo. É muito bom poder contar com você minha amiga! Eu não teria a mesma segurança sem você ao meu lado todos esses anos. Estamos juntas pra sempre! Amo você!

PRECISO DE ALGUÉM QUE ME OLHE NOS OLHOS QUANDO FALO
QUE OUÇA AS MINHAS TRISTEZAS E NEUROSSES COM PACIÊNCIA
E, AINDA QUE NÃO COMPREENDA, RESPEITE OS MEUS SENTIMENTOS
PRECISO DE ALGUÉM AMIGO O SUFICIENTE PARA DIZER-ME AS VERDADES QUE NÃO QUERO
OUVIR, MESMO SABENDO QUE POSSO ODIÁ-LO POR ISSO
NESSE MUNDO DE CÉTICOS, PRECISO DE ALGUÉM QUE CREIA, NESSA COISA MISTERIOSA,
DESACREDITADA, QUASE IMPOSSÍVEL: A AMIZADE
PRECISO DE UM AMIGO QUE RECEBA COM GRATIDÃO O MEU AUXÍLIO, A MINHA MÃO
ESTENDIDA. MESMO QUE ISTO SEJA MUITO POUCO PARA SUAS NECESSIDADES
PRECISO DE UM AMIGO QUE TAMBÉM SEJA COMPANHEIRO, E QUE NO MEIO DA TEMPESTADE,
GRITE EM CORO COMIGO: "NÓS AINDA VAMOS RIR MUITO DISSO TUDO" NÃO PUDE ESCOLHER
MUITAS COISAS QUE NASCERAM COMIGO, MAS POSSO ESCOLHER MEU AMIGO... E NESSA BUSCA
EMPENHO A MINHA PRÓPRIA ALMA, POIS COM UMA AMIZADE VERDADEIRA, A VIDA SE
TORNA MAIS SIMPLES, MAIS RICA E MAIS BELA...

(CHARLES CHAPLIN)

À minha família de Araraquara **Sálua, Sâmia e Sâmara**. Ter sempre a certeza de vocês estarem ao meu lado faz toda a diferença. Meu carinho só cresce com o tempo por pessoas tão especiais.

Ao casal mais especial, **Giovana e Marcell**, por toda a ajuda não só no trabalho mas também na vida. É difícil encontrar pessoas que nos fazem avançar na vida torcendo e indicando novos caminhos, e vocês são exatamente isso. Não tenho palavras pra demonstrar a minha gratidão.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética, **Suzane, Giovana, Sâmia, Rafael, Romerito, Thamires, Bruna e Larissa**. É tão bom gostoso o ambiente que construímos, que até fica um vazio quando não estamos juntos, nos apoiando, e formando um verdadeiro grupo. Vocês fazem parte da grande porcentagem de alegria do meu dia!

Às minhas amigas **Livia Amato e Flávia Cera** por serem minha referência, minha boa lembrança. Sou mais feliz quando tenho vocês por perto. Sinto saudades, sempre.

Ao meu amigo **Rafael Nepomuceno** e sua família por sempre serem tão carinhosos e prontos à ajudar. Os momentos que passamos juntos são inesquecíveis.

À **Mayara Terenzi** por todas as palavras e atitudes de carinho. Sua força e responsabilidade me inspiram a buscar ser uma pessoa melhor.

Aos meus amigos do Laboratório da Universidade da Pensilvânia **Asal Mir e Hatem Alqahtani**, pessoas maravilhosas com as quais tive oportunidade de conviver e aprender muito.

Aos meus amigos **Jôice, Mayra, Gabriela, Márcia** e especialmente **Marcelo e Deborah Mattos**. Vocês são com certeza os presentes que a Filadélfia me deu! Sempre e senti amparada com vocês por perto. Nossos encontros me transmitiam uma energia pura e uma força inexplicável. Muito obrigada!

À minha família da Ihouse, **Amanda Chu, Ricardo Feliciano, Daniel Ferraz, Ricardo Massarico, Fernanda Mafra, Rodrigues e Milene Alves**. Todo segundo divido do com vocês se tornou uma lembrança carregada de sentimentos bons. Cada um da sua maneira foi importante para a construção dessa linda amizade.

Aos meus queridos amigos **Felipe César, Mateus Quintano e Michele Tonet**. Vocês me consolaram em momentos difíceis, mas também demos muitas risadas juntos. Desses e muitos outros momentos surgiu uma amizade que quero para o resto da vida.

Às minhas grandes amigas da inesquecível Turma 80, **Karen Altieri e Donha**. Momentos inesquecíveis ao lado de vocês. Não há distância capaz de mudar o tamanho do carinho que tenho pelo o que temos. Gratidão e saudades são sentimentos constantes a cada segundo que penso nas duas!

À **Ana Paula**. A pessoa mais dedicada que já conheci. É admirável o amor com que exerce seu trabalho, um verdadeiro exemplo. Obrigada por toda paciência ao tirar minhas dúvidas, toda atenção nos momentos em que precisei da sua ajuda, e especialmente por todo o carinho durante esses anos.

À **Cacilda**. Parceira da família há tantos anos! Fiel amiga, mostra o verdadeiro valor da amizade à cada momento. Cacildão! Você mais do que ninguém sabe que o carinho que temos por você é de muito tempo e não tem fim. Obrigada por estar sempre ao nosso lado, em qualquer circunstância.

Aos Professores **José Eduardo Sampaio e Silvana Perez Orrico**, verdadeiros exemplos de conduta profissional. Meu respeito por vocês vai além da admiração. Ao longo dos anos desenvolvemos uma relação de amizade e eu sou muito grata por isso.

À **Profa. Dra. Edivani**, que posso afirmar sem dúvida que foi a pessoa que mais me ajudou na Faculdade de Odontologia da Araraquara. Pessoa linda, mulher exemplar. Qualquer coisa que eu diga nunca será o suficiente pra agradecer por TUDO o que fez por mim. Obrigada Professora, serei eternamente grata.

À **Profa. Dra. Ticiania** Capote por estar sempre presente e pronta para oferecer um abraço e uma conversa madura. Espero poder retribuir tudo o que fez por mim. Obrigada!

À **Tia Silmara**, sempre tão presente! Tão única! Se atitudes valem mais que mil palavras, você não precisa falar nada nunca. Porque suas atitudes mostram sempre o quão sensacional você é Tia! Você é que está ali fazendo levantar nos piores momentos, vibrando nos melhores, em todos! Eu te amo desde sempre, mesmo!

À **Família Ruggiero**, pelo carinho de sempre. Estamos juntos desde sempre. E estar junto, nem sempre é estar perto. Aprendi isso com vocês. Podemos ficar o tempo que for sem se ver, ou se falar, mas o que foi construído não muda nunca. Saibam que a presença de vocês foi o maior e melhor presente de formatura que ganhei. E sempre que lembro daquela surpresa meus olhos enchem de lágrima, pois a alegria que senti, foi indescritível.

"CADA PESSOA QUE PASSA EM NOSSA VIDA, PASSA SOZINHA.
É PORQUE CADA PESSOA É ÚNICA E NENHUMA SUBSTITUI A OUTRA.
CADA PESSOA QUE PASSA EM NOSSA VIDA PASSA SOZINHA E NÃO NOS DEIXA SÓ, PORQUE
DEIXA UM POUCO DE SI E LEVA UM POQUINHO DE NÓS.
ESSA É A MAIS BELA RESPONSABILIDADE DA VIDA E A PROVA DE QUE AS PESSOAS NÃO SE
ENCONTRAM POR ACASO"

(CHARLES CHAPLIN)

AGRADECÇO...

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

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**, pelo apoio financeiro (Processo 2013/17887-8).

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, Prof. Dr. **Elcio Marcantonio Junior**, Profa. Dra. **Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, Prof. Dr. **Carlos Rossa Júnior**, Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, Profa. Dra. **Silvana Regina Perez Orrico**, **Daniela Leal Zandim Barcelos** que colaboraram com a minha formação e em especial ao Prof. Dr. **José Eduardo César Sampaio** pela orientação no estágio de docência.

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

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

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

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

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

Aos **Pacientes**, que tanto colaboraram com a pesquisa, contribuindo com a realização dos exames clínicos e coletas. Muito obrigada!

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

"VOCÊ TEM QUE ENCONTRAR ALGO QUE VOCÊ AME O SUFICIENTE PARA
SER CAPAZ DE ACEITAR RISCOS, PULAR SOBRE OS OBSTÁCULOS E
AVANÇAR SOBRE OS MUIROS QUE SERÃO SEMPRE COLOCADOS NA SUA
FRENTE. SE VOCÊ NÃO TEM ESTE TIPO DE SENTIMENTO POR AQUILO QUE
ESTÁ FAZENDO, VOCÊ PARARÁ NO PRIMEIRO GRANDE OBSTÁCULO."

(GEORGE LUCAS)

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.

RESUMO

A Doença Periodontal (DP) tem caráter multifatorial, com influência da presença de microrganismos periodontopatogênicos, suscetibilidade genética do hospedeiro, entre outros. O tecido periodontal inflamado produz dentre outras citocinas, a Interleucina 8 (IL-8). Na literatura científica há informações conflitantes acerca dos níveis de IL-8 em fluido crevicular gengival de pacientes com e sem DP. Estudos prévios realizados por nosso grupo identificaram que pacientes carregando o haplótipo ATC/TTC no gene *IL8* foram 2 vezes mais suscetíveis à DP e que esses pacientes mesmo com menor desafio microbiano, pareciam desenvolver a DP mais exacerbadamente comparados aos indivíduos considerados não suscetíveis à DP pela ausência daquele haplótipo. Como esses resultados foram obtidos de um estudo clínico, estudos in vitro se mostraram necessários para investigar a funcionalidade dos haplótipos no gene *IL8*. O objetivo deste trabalho foi verificar na literatura científica se os níveis de IL-8 estão aumentados ou não mediante a presença da DP e se, por meio de ensaios in vitro controlados, os mencionados haplótipos no gene *IL8* podem influenciar a funcionalidade e expressão deste e outros genes importantes para a resposta imune. Realizamos uma criteriosa revisão sistemática da literatura seguida de meta-análise enfocando a quantificação de mRNA e proteína IL-8 em tecido gengival, saliva e fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes com DP comparados a indivíduos periodontalmente saudáveis. Verificamos maior expressão gênica de *IL8* e da proteína IL-8 nos tecidos gengivais de pacientes com

DP, enquanto níveis proteicos de IL-8 mostraram níveis variáveis na saliva e FCG. Também investigamos em células isoladas do sangue periférico de pacientes carregando diferentes haplótipos no gene *IL8*, a possível influência destes na expressão de genes do sistema imune. A funcionalidade destes haplótipos no gene *IL8* foi também investigada após edição genética em linhagem celular por meio do sistema CRISPR-CAS9 seguida de recombinação homóloga. Conjuntamente observamos que perante estímulos microbianos o haplótipo ATC/TCC foi associado à maior expressão gênica e funcionalidade do gene *IL8* em comparação ao outro haplótipo ATT/TCC. Como conclusão geral notou-se que em tecido gengival há concordância na literatura sobre maiores níveis de mRNA e proteicos de IL-8 associados à DP, e que o haplótipo no gene *IL8* previamente associado com suscetibilidade à DP mostrou-se funcional influenciando a expressão gênica.

Palavras-Chave: Polimorfismo Genético, Expressão Gênica, Sistema Imunológico, Interleucina-8, Metanálise

Finoti LS. *Interleukin 8* gene haplotype functionality investigation in the chronic periodontitis context. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is a multifactorial disease, influenced by the periodontopathogenic microorganisms' presence, host genetic susceptibility, among others. The inflamed periodontal tissue produces amongst other cytokines the Interleukin-8 (IL-8). In the scientific literature there are conflicting information about the IL-8 levels in gingival crevicular fluid of patients with and without DP. Previous studies of our group found that patients carrying the haplotype ATC/TTC in *IL8* gene were 2 times more susceptible to PD and these same patients with lower microbial challenge develop PD more exaggeratedly compared to individuals considered not susceptible to PD by absence of that haplotype. As these results were obtained from a clinical study, in vitro studies are necessary to investigate the functionality of the *IL8* gene haplotypes. The objective of this study was to investigate whether IL-8 levels are increased or not by the presence of PD and, through controlled in vitro assays, the aforementioned haplotypes in *IL8* gene can influence the functionality and expression of this and other important genes to the immune response. We conducted a rigorous literature systematic review followed by meta-analysis focusing on the mRNA and IL-8 protein quantification in gingival tissue, saliva and gingival crevicular fluid (GCF) of patients with PD compared to periodontally healthy individuals. We found a higher *IL8* gene expression and IL-8 protein in the gingival tissues of PD patients, whereas protein levels of IL-8 showed varying levels in GCF and saliva. We also investigated cells from the patient's peripheral blood carrying

different haplotypes in *IL8* gene, their possible influence on the expression genes of the immune system. The functionality of these haplotypes in *IL8* gene was also investigated after genetic edition in cell line using CRISPR-CAS9 followed by homologous recombination system. It was observed that against microbial stimuli the ATC/TTC haplotype was associated with increased gene expression and function of the *IL8* gene compared to the ATT/TCC haplotype. As a general conclusion it was noted that in gingival tissue there is an agreement in the literature on higher levels of mRNA and protein for IL-8 associated with PD, and that the *IL8* haplotype previously associated with susceptibility to chronic periodontitis proved functional, influencing gene expression.

Key words: Polymorphism, genetic, gene expression, Immune System, Interleukin-8, Meta-analysis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	21
PROPOSIÇÃO.....	25
CAPÍTULO 1	27
CAPÍTULO 2	54
CAPÍTULO 3	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS.....	112
APÊNDICE.....	119
<i>APÊNDICE A- METODOLOGIA DETALHADA - CAPÍTULO 1.....</i>	<i>119</i>
<i>APÊNDICE B - METODOLOGIA DETALHADA - CAPÍTULO 2.....</i>	<i>123</i>
<i>APÊNDICE C - METODOLOGIA DETALHADA - CAPÍTULO 3</i>	<i>132</i>
ANEXOS.....	145

INTRODUÇÃO GERAL

A Doença Periodontal (DP) é uma condição inflamatória crônica desencadeada e mantida por estímulo microbiano, especialmente por bactérias Gram-negativas anaeróbicas ²³. A presença de bactérias Gram-negativas no biofilme subgengival é considerada um fator necessário, mas não suficiente para a etiologia da doença periodontal destrutiva, sendo o dano tecidual observado clinicamente, em sua maior parte, consequência da resposta imune do hospedeiro ¹⁶.

A resposta imune do indivíduo frente à infecção por periodontopatógenos se mostra variável, determinada em parte pelas influências ambientais e sistêmicas ^{27, 30, 32} e em parte pela carga genética do indivíduo ³³. A suscetibilidade genética do indivíduo à doença periodontal tem sido demonstrada, por exemplo, com relação a genes que codificam proteínas do sistema imune ^{31, 38, 40}. Dentre estas proteínas estão as citocinas, que constituem um grupo diverso de pequenas proteínas e glicoproteínas as quais apresentam um vasto patamar de funções biológicas potentes.

Entre as citocinas, uma importante quimiocina com função pró-inflamatória que tem sido associada à DP é a interleucina-8 (IL-8), que secretada localmente induz o extravasamento de neutrófilos do sangue periférico para o sítio afetado e também atrai numerosos neutrófilos presentes na lâmina própria e no epitélio gengival ^{2, 15, 17}. Apesar da ação de neutrófilos ser uma barreira inicial contra bactérias periodontopatogênicas, a contínua e excessiva presença de IL-8 pode contribuir para o acúmulo de neutrófilos com subsequente destruição local dos tecidos periodontais ^{35, 39, 46}.

Lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias como *P. intermedia* e *P. gingivalis* induzem a expressão RNA mensageiro (RNAm) da IL-8 em fibroblastos de gengiva humana em cultura ⁴¹ e da proteína por células do epitélio gengival ²⁹ e leucócitos ³. Sendo assim, níveis mais elevados de RNAm da IL-8 foram detectados em indivíduos com periodontite crônica e agressiva quando comparados a indivíduos sem doença ¹⁹. No entanto, quando a quantificação da proteína é investigada, observa-se uma contradição nos resultados encontrados, alguns mostrando uma maior e outros mostrando uma menor concentração de IL-8 no fluido gengival de pacientes com DP em relação a indivíduos sem periodontite ^{6, 18, 21, 28, 43}.

Isso motivou a realização de um dos estudos apresentados nesta Tese, uma vez que a revisão sistemática é considerada uma investigação científica com método pré-planejado rigoroso e claro de identificação e avaliação de artigos científicos originais, recuperados nas principais fontes de informações científicas com especial atenção a qualidade metodológica dos estudos ^{36, 47}. A pesquisa da literatura realizada deve ser abrangente de modo a captar todos os possíveis artigos relevantes sobre o tema em questão, de modo reproduzível. A meta-análise é realizada quando há possibilidade de utilização de métodos estatísticos com resultados dos estudos primários agrupando dois ou mais estudos semelhantes ⁷. Por meio desta, é possível uma melhor avaliação da contradição nos resultados encontrados acerca do nível de IL-8 em pacientes com e sem DP.

Diferenças individuais nos níveis de interleucinas podem ser atribuídas à polimorfismos em seus genes, principalmente se dentro de regiões chamadas exons ou do promotor. Contudo um crescente número de estudos tem investigado, nos mesmos

indivíduos com DP, a combinação de mais de um fator de influência, por exemplo, polimorfismo genético e presença de determinados microrganismos periodontopatogênicos^{8, 44, 48}.

Estudos recentes 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)³⁷. Em sequência, outro estudo investigou se o haplótipo ATC/TTC no gene *IL8* associado à suscetibilidade à DP influenciaria a produção da citocina IL-8⁸. No entanto, não foi encontrada no fluido crevicular gengival diferença nos níveis proteicos de IL-8 definida pela carga genética diferencial dos pacientes. Dos mesmos pacientes foi realizada coleta para análise microbiológica nos mesmos sítios da coleta imunológica¹².

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 *Interleucina 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^{13, 14}. 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, 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. Há poucas informações sobre o papel funcional de haplótipos nos genes *IL8*, além destes serem frequentemente escolhidos para investigação em estudos caso-controle de associação com as mais diversas patologias^{25, 26}. Assim, percebe-se que é de grande relevância o preenchimento dessa lacuna no conhecimento da genômica funcional.

No entanto o fato dos haplótipos de nosso interesse do gene *IL8* serem formados por SNPs que estão parte na região promotora do gene e parte em intron é o que torna bem mais complexa a investigação da sua funcionalidade. Utilizando o inovador sistema de edição gênica¹¹ CRISPR-Cas9-HRD (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - Homology-Directed Repair*), foi possível compreender melhor a funcionalidade dos haplótipos do gene *IL8*. Vale salientar que, até o momento essa metodologia inovadora ainda não foi empregada na área da Odontologia.

PROPOSIÇÃO

Proposição Geral

Revisar na literatura científica se os níveis da quimiocina IL-8 estão aumentados ou não mediante a presença da Doença Periodontal e se, por meio de ensaios *in vitro* controlados, os haplótipos formados por polimorfismos nesse gene previamente associados à suscetibilidade à periodontite crônica, podem influenciar a funcionalidade e expressão deste e outros genes importantes para a resposta imune.

Proposições específicas

Capítulo 1: Meta-analysis association study between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease

Desenvolver uma revisão sistemática relacionada aos níveis de mRNA no tecido gengival e da proteína IL-8 na saliva e tecido gengival, além de uma meta-análise com foco na concentração de IL-8 no fluido crevicular gengival de indivíduos com e sem CP.

Capítulo 2: Functional analysis of differences in transcriptional activity conferred by haplotypes in the *Interleukin 8* gene

Investigar a funcionalidade de haplótipos previamente associados com a periodontite crônica no gene *IL8*, com foco em sua potencial influência na atividade transcricional utilizando ensaios controlados *in vitro*.

Capítulo 3: Investigation of the functional role of human Interleukin 8 gene haplotype by CRISPR/Cas9 mediated genome editing

Testar a hipótese de que haplótipos formados pelos polimorfismos -251(T/A), +396(T/G) e +781(C/T) no gene *IL8* podem influenciar os níveis transcricionais, translacionais e migração de neutrófilos. Para isso foi utilizado um novo meio para a edição do genoma aliado a um modelo de reparação homóloga para verificar os efeitos funcionais relacionados aos diferentes haplótipos no gene *IL8*.

CAPÍTULO 1

Meta-analysis association study between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease

Livia S Finoti¹, Rafael N Oliveira¹, Suzane C Pigossi¹, Sâmia C T Corbi¹, Rodrigo
Secolin², Raquel M Scarel-Caminaga^{3*}

1. Department of Oral Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, UNESP- Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil.
2. Department of Medical Genetics, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil
3. Department of Morphology, School of Dentistry at Araraquara, UNESP- Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil.

Running Title: Meta-analysis of IL-8 in Periodontitis

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

ABSTRACT

Objective: Current publications present contradictory findings regarding interleukin-8 (IL-8) levels in patients with chronic periodontitis (CP). The purpose of this systematic review was to compile evidences of the *IL8* gene expression and protein levels in gingival tissue, saliva and gingival crevicular fluid (GCF) investigated in patients with CP.

Design: Electronic search was conducted in October 2015 using combinations of the following terms: “IL-8” and “Periodontal Disease”; “IL-8” and “Periodontitis”; “Interleukin-8” and “Periodontal Disease”; “Interleukin-8” and “Periodontitis”. For searching we utilized general terms such as periodontal disease (PD), but for the analyses we restrict the studies to CP. A total of 31 publications evaluating mRNA and IL-8 protein levels in GCF, gingival tissue and saliva were included in the systematic review. Furthermore, a meta-analysis was made focusing on the IL-8 levels in GCF of patients with or without CP.

Results: All studies found higher *IL8* mRNA levels in gingival tissue of CP patients, and the majority of studies found higher IL-8 protein levels in biopsies of gingival tissue of individuals with moderate to severe CP. Four studies investigating the IL-8 levels in saliva showed inconclusive results. In spite of the general GCF studies seemed to indicate IL-8 higher levels in CP patients, the meta-analysis results showed that patients with CP presented significantly lower IL-8 levels (pg/ μ l) in GCF than the healthy control subjects.

Conclusions: We concluded by this systematic review that *IL8* gene expression and IL-8 protein levels were higher in gingival tissues of CP patients when compared to periodontally health individuals. There are conflicting evidences regarding IL-8 levels in

saliva and GCF, since although it seems that higher IL-8 levels were found associated with CP, the meta-analysis revealed the opposite.

Keywords: Interleukin-8; Periodontal Diseases; Gingival Crevicular Fluid, Meta-analysis, Saliva, Gingiva

INTRODUCTION

The manifestation of periodontal diseases results from the interaction of host defense mechanisms, microbial agents, environmental and genetic factors (1). In patients with periodontitis, more frequent occurrence and higher quantities of red-complex bacteria were found. Bacterial metabolites and related molecules trigger the expression of proinflammatory cytokines, which have been associated with immunopathology of periodontitis (2).

Inflammation is driven and maintained by cytokines network, such as chemokines, which are continuously produced by immune cells (3). Chemokines are a large family of chemotactic cytokines that stimulate the recruitment of inflammatory cells. They are produced by a number of cell types in the periodontium, such as fibroblasts, endothelial cells, macrophages, lymphocytes, and mast cells (4).

The interplay between the species of subgingival biofilms and the adjacent periodontal tissues is often marked by an increase in gingival inflammation and the release of biologically active substances, such as cytokines levels, into gingival crevicular fluid (GCF) (5). However, sometimes the results obtained by the GCF analysis did not agree with the evaluation in the gingival tissue of patients with the same diagnostics.

Studies based on GFC analysis also exhibit contradictory findings regarding cytokines levels in patients with and without chronic periodontitis (CP) (6-10). Moreover, some publications have recently addressed the potential diagnostic properties of saliva, since it could be used to help diagnose oral diseases and systemic conditions (11, 12). Importantly, inflammatory cytokines detected in whole saliva did not come from major salivary glands secretions. The GCF is the probable source of these cytokines(13).

The analysis of oral fluids (GCF and saliva) can reveal understanding insights of both clinically healthy and diseased status, including host's biological markers levels (14). GCF samples collected from the periodontal sites have been submitted to various cytokines quantifications mainly by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), resulting in a large number of publications, which investigated different periodontal conditions (15-19). In regard to biomarkers analysis in saliva, the number of studies has been increasing, according to the development of proper methodology (20). Meantime gingival tissues have been utilized for assessing the transcriptional level of cytokines (21-24), as well as for in situ hybridization (25, 26) or immunohistochemistry (25-29).

One of the cytokines of interest in these studies is the Interleukin-8 (IL-8). The IL-8 is a potent chemoattractant cytokine and activator of neutrophils in inflammatory regions and it is released from endothelial cells, gingival fibroblasts, neutrophils, monocytes and phagocytes in the gingival crevice (30, 31). The unique coordinated expression of IL-8 facilitates the transit of neutrophils from the highly vascularized gingival tissue to the gingival crevice (26, 32).

In spite of the importance of the IL-8 chemokine in the panel of CP, a variety of studies have showed contradictory findings mainly regarding the IL-8 levels in GCF of

patients with CP. Therefore, for contributing to reach more confident information, the aim of this study was to develop a systematic review regarding the mRNA and protein levels of the IL-8 in saliva and gingival tissue, in addition to the meta-analysis focusing on IL-8 concentrations in GCF of patients with CP.

MATERIAL AND METHODS

- **Focused Question**

The addressed focused question was "Do individuals with chronic periodontal disease have different IL-8 levels in GCF, saliva and gingival tissue compared with health patients?"

- **Eligibility Criteria**

We selected original research articles according to the following inclusion criteria: 1) human clinical studies; 2) cytokine profile in the GCF, saliva, and gingival tissue of patients with and without CP; 3) articles published in the English language. Original research articles that failed to follow three criteria described above were excluded from the systematic review. Furthermore, experimental studies, letters to the editor, historical reviews, and unpublished articles were excluded.

- **Literature search**

Electronic searches of the PubMed, Web of Science and Scopus databases were conducted in October 2015 for publications that investigated the levels of Interleukin-8 in

GCF, saliva, and gingival tissue in individuals with chronic periodontal disease compared with health individuals. Relevant papers were identified through a search in databases using the following terms in some combinations: “IL-8” and “Periodontal Disease”; “IL-8” and “Periodontitis”; “Interleukin-8” and “Periodontal Disease”; “Interleukin-8” and “Periodontitis”. A literature search was conducted using the EndNote Program™ X7 version (Thomson Reuters, New York, NY, USA) in order to eliminate duplicate references. For searching we utilized general terms such as periodontal disease (PD), but for the analyses we restrict the studies to CP. Including PD studies, it could decrease the chances of losing studies that had investigated CP, even if they had also investigated aggressive periodontitis (AgP).

The initial search for assessment of titles and abstracts was performed by two investigators (L.S.F. and R.N.O.) independently, and the results were checked for agreement. Then, the full text of the articles judged by title and abstract to be relevant were read independently and assessed regarding the selection criteria of inclusion and exclusion. For conflicting evaluations, an agreement was reached following a discussion.

- **Data extraction**

Three investigators (L.S.F., S.C.P., and R.N.O.) carefully reviewed independently all studies and extracted the data using a standardized form. Among the studies, we classified three types of studies according to the biological sample collected for analysis: GCF, saliva, and gingival tissue.

- **Meta-analysis of the IL-8 GCF levels regarding CP**

For performing the meta-analysis, it was necessary to select studies that presented numerical values of media and standard deviation of IL-8 levels in the GCF of patients by ELISA (6, 9, 33-37). The meta-analysis was made combining results of different studies (Table 1), providing a numerical estimate of the overall effect of interest. It is noteworthy that in those GCF studies we found different units for measuring the IL-8 levels: pg/site and pg/ μ l. Because of this fact, papers for this meta-analysis study were divided according to the unit of IL-8 measure (Figure 2). Six studies presented their results in pg/ μ l (6, 33-37), and three studies presented their results in pg/site (9, 35, 37). It is worth to mention that Jin et al. 2000 and Tsai et al. 1995 presented their results as both pg/ μ l and pg/site.

The variance of IL-8 levels was estimated using the 95% confidence interval (CI). The pooled effect was considered significant if two-sided p-values <0.05 were reached. Statistical software (Review Manager [RevMan]. Version 5.1. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2011) was used to pool the data and produce the forest plots. Forest plots for each meta-analysis present the raw data (i.e. means, standard deviations [SD] and sample sizes), point estimates (displayed as blocks) and CIs (displayed as lines) for the chosen effect, as well as heterogeneity statistics (Chi^2 and I^2), total number of participants per group, overall average effect (Mean Difference and Z-statistics) and percent weight given to each study. Chi-square (Chi^2) and inconsistency index (I^2) tests were used to assess the heterogeneity of the studies included in this meta-analysis. The heterogeneity of the trials will be significantly indicated by $I^2 > 25\%$ and $p < 0.1$, instead of $p < 0.05$, since that test has a low power. Random-effects

model (Der Simonian-Laird method) was applied.

RESULTS

The electronic search generated 4,455 hits, which represented 944 unique citations. A total of 85 publications were obtained as full-text copies, and 54 of these publications were later excluded on the basis of a priori criteria (Figure 1). The remaining 31 publications were divided according to the biological sample collected for analysis: 17 studies used GCF as samples, and for saliva and gingival tissue samples we obtained 4 and 10 studies, respectively.

- **Findings of the IL-8 levels in GCF and Meta-analysis**

A total of 17 studies evaluated IL-8 profiles in the GCF of patients with and without CP. According to the Table 1, only two studies have not used ELISA method for cytokine detection (19, 38). The subject samples ranged from 18 patients to 80. Thirteen studies presented higher and other four lower IL-8 levels in diseased group in comparison to health individuals.

This elevated number of publications and contradictions among studies, motivated us to perform the meta-analysis for assessing the IL-8 levels in GCF of patients with and without CP. We observed by the heterogeneity test a statistically significant high heterogeneity among studies for pg/ μ l analysis ($I^2 = 97\%$; $p < 0.0001$), as well as for pg/site analysis ($I^2 = 97\%$; $p < 0.0001$).

In terms of pg/ μ l, the random effect model in meta-analysis results showed an estimated mean difference of -260.34 pg/ μ l (95% confidence interval (CI): -463.14 – -

57.54; Figure 2a). However, in terms of pg/site, meta-analysis revealed no significant mean difference of -15.37 pg/site (95% CI: -78.27 - 47.54; Figure 2b). These findings mean that for pg/ μ l, patients with CP demonstrated significant lower levels of IL-8 in comparison to healthy individuals, while no significant results were observed for pg/site.

- **Findings of the IL-8 levels in saliva**

According to the Table 1, the electronic search generated 4 studies assessing cytokine profile (including the IL-8) in the saliva of patients with and without CP (39-42). Only one study used Luminex evaluation method (42) and the other three used the ELISA method (39-42). The subject samples ranged from 31 patients to 118. In regard to the assessed parameters, probing pocket depth was evaluated by three studies, whereas clinical attachment level was evaluated by two studies and bleeding on probing by 1. Two studies presented higher while other two studies detected lower IL-8 protein levels in the diseased group. Interestingly, significant difference was found only in one study, which found higher levels of the IL-8 in control subjects.

- **Findings of the IL-8 levels in gingival tissue**

All of the 4 studies investigating the *IL8* mRNA levels (*IL8* gene expression) using qRT-PCR demonstrated higher levels of *IL8* mRNA in gingival tissue of individuals with chronic periodontitis in comparison to health individuals (Table 1) (21-24). In regard to the IL-8 protein levels investigated in gingival tissues of individuals with and without CP, the studies utilized different methodologies including ELISA (3 studies) (22, 27, 43), Western-blot (1 study) (24) and immunohistochemistry (5 studies)

(25-29), as can be viewed in the Table 1. Excepting just one ELISA study, the two other ELISA and the Western-blot studies showed higher levels of IL-8 protein levels in gingival tissues of patients with CP. These results agree with those found by ELISA in GCF. For immunohistochemistry, controversial results of the IL-8 protein presence in the health/diseased gingival tissue were observed. Two of those studies found higher levels of IL-8 in individuals with periodontal disease and only one study found higher levels of IL-8 in health tissues. The remaining two of those studies only evaluated the IL-8 presence in health and diseased gingival tissue; without comparing the IL-8 levels between individuals with and without chronic periodontitis.

DISCUSSION

This study investigated the mRNA and protein IL-8 levels in GCF, saliva and gingival tissues of patients with CP compared with periodontally healthy individuals. In general, 4 studies demonstrated higher levels of *IL8* mRNA in gingival tissue of individuals with chronic periodontitis in comparison to health individuals. In this way, against the stimulus of periodontopathogens the innate immune response is triggered. The analysis of the IL-8 protein levels in gingival biopsies showed higher IL-8 concentrations in gingival tissue of individuals with moderate to severe CP, as demonstrated in 7 of 10 studies utilizing ELISA, Western blot, and immunohistochemistry. This last method showed maximal IL-8 detection in the junctional epithelium adjacent to microorganisms' infection associated with PMN infiltration (26).

The IL-8 protein is released to GCF and saliva. It is noteworthy that from 17 studies regarding the IL-8 protein levels assessed by ELISA, 13 of them demonstrated

higher IL-8 concentrations in GCF of patients with CP (Table 1). However, there were 4 studies showing conversely results. Considering the studies that utilized the saliva, the IL-8 protein levels were very variant and inconclusive. In spite of the majority of studies seemed to indicate that IL-8 protein levels can be higher in the GCF of CP patients, a possible explanation for discrepant findings might reside in the severity of disease among the studies. More severe periodontal disease, exemplified by their higher mean percentage of sites with pocket depth, might be associated with higher IL-8 levels (12, 42). In addition, and importantly, differences in the methods of GCF (time of collection with paper points) and saliva collection (stimulated or unstimulated), processing (speed and time of centrifugation), storage (time, temperature and addition or not of protease inhibitors) and in the methodology used for biomarkers quantification (ELISA vs. Luminex) might also have relevant impact on the differences in results (42).

Opposing to the observation of explanatory studies results there are our presently developed meta-analysis findings. Some of the studies presented in the Table 1 were eligible for conducting the meta-analysis. Interestingly, considering in the meta-analysis only studies that utilized the pg/ μ l as unit of IL-8 measurement, we found that patients with CP presented significantly lower IL-8 GCF levels than the healthy control subjects (Figure 2a). Zhang et al. demonstrated that both gingival and oral epithelial cells infected with *P. gingivalis* produced IL-8, but after infection, these cells continue to express IL-8 mRNA although the accumulation of the secreted protein could not be detected. Therefore it was suggested that the IL-8 could be degraded locally by *P. gingivalis* proteinases (44), which would explain the results of meta-analysis.

Also important to lead to discrepant results among studies was the difference regarding the unit of IL-8 measurement in the GCF. Chung et al. mentioned that the function and biological activity of different mediators should influence the unit of measurement (6). In case of IL-8 and other cytokines, in which functional activity depends on binding and interaction with cell surface receptors, these mediators should be more appropriately reported as GCF concentrations. The majority of case-control studies, which were eligible in this meta-analysis fit in this concept, i.e., they presented the data as pg/ μ l. Interestingly, a significant result found in this meta-analysis was obtained only considering the IL-8 measurement as pg/ μ l. In the statics it is evident the importance of the unit that different reports used for measure the IL-8. It was observed no agreement among researchers concerning methodology for measuring IL-8 concentration in GCF (6, 36). In the literature it was found three methods of measurement to quantify IL-8: (i) total activity per timed sample (amount or units per 30-second sample); (ii) protein concentration (amount or units per unit of GCF volume); or (iii) total activity (amount per sample or site). Lamster et al. suggested that in GCF the total cytokine amount might be more representative of the disease status than the evaluation of protein concentration (45). In addition, Chapple et al. emphasized that volumes are very variable regardless inflammatory status. Therefore, they proposed to utilize the total marker activity per 30s GCF sample rather than the concentration of the marker, because it might provide a better correlation with health or disease status (46). To measure gingival fluid, the use of micropipettes, ninhydrin staining and fluorescein is complicated and time-consuming, but an electric measuring device, “Periotron”, is efficient and it digitally demonstrates the amount of gingival fluid (47). Therefore, the use of Periotron gives confident

measurement of GCF volume, which is considered for calculating the protein concentration present in the GCF. This procedure eliminates the influence of gingival inflammatory status in a protein measurement in GCF. Consequently, to quantify a protein in the GCF, it seems that the best choice is utilizing the Periotron and the pg/ μ l as unit of measurement (6).

One can note that in the last few years that there was an increase in the number of meta-analysis studies that reflects the researcher's interest in this kind of study. In this context, the present meta-analysis along with systematic review study contributes to the area because the methodological care used, since it was developed according to the QUOROM statement (48). Rigor in eligibly reports in a meta-analysis and systematic reviews studies is very important, and reliable results depend on this. The main limitations of the present study were differences regarding the criteria used by authors to classify an individual as periodontally diseased or healthy. Maybe this is the reason for the high heterogeneity presented in the statistical analysis employed in the meta-analysis, making it not very conclusive. The challenge for future meta-analysis studies is to find reports as similar as possible mainly regarding clinical parameters for selecting patients, unit of cytokine measurement and the utilized sampling.

In conclusion, this systematic review showed higher *IL8* gene expression and IL-8 protein levels in gingival tissues of individuals with chronic periodontitis compared with periodontal health patients. However, conflicting findings were observed regarding IL-8 protein levels in GCF and saliva, mainly considering general GCF studies (IL-8 higher levels in CP patients) and the present meta-analysis (IL-8 lower levels in CP patients).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol Res* 1991;**26**(3 Pt 2):230-242.
2. Ferreira SB, Jr., Trombone AP, Repeke CE, Cardoso CR, Martins W, Jr., Santos CF, et al. An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. *Infect Immun* 2008;**76**(8):3725-3734.
3. Andrukhov O, Ulm C, Reischl H, Nguyen PQ, Matejka M, Rausch-Fan X. Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *J Periodontol* 2011;**82**(6):885-892.
4. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2008;**79**(8 Suppl):1585-1591.
5. Gursoy UK, Kononen E, Uitto VJ. Stimulation of epithelial cell matrix metalloproteinase (MMP-2, -9, -13) and interleukin-8 secretion by fusobacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2008;**23**(5):432-434.
6. Chung RM, Grbic JT, Lamster IB. Interleukin-8 and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 1997;**24**(3):146-152.
7. 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. *J Periodontol* 2000;**71**(10):1535-1545.

8. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-6 and interleukin-8 levels in chronic periodontitis. *Int J Dent* 2012;**2012**:362905.
9. Konopka L, Pietrzak A, Brzezinska-Blaszczyk E. Effect of scaling and root planing on interleukin-1beta, interleukin-8 and MMP-8 levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res* 2012;**47**(6):681-688.
10. Teles RP, Sakellari D, Konstantinidis A, Socransky SS, Haffajee AD. Application of the checkerboard immunoblotting technique to the quantification of host biomarkers in gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 2009;**80**(3):447-456.
11. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert review of proteomics* 2007;**4**(4):531-538.
12. Miller CS, King CP, Jr., Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *Journal of the American Dental Association* 2006;**137**(3):322-329.
13. Ruhl S, Hamberger S, Betz R, Sukkar T, Schmalz G, Seymour RA, et al. Salivary proteins and cytokines in drug-induced gingival overgrowth. *Journal of dental research* 2004;**83**(4):322-326.
14. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 2010;**8**(7):481-490.
15. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003;**30**(12):1046-1052.

16. Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, et al. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol* 2010;**81**(7):1056-1063.
17. Yamazaki K, Honda T, Oda T, Ueki-Maruyama K, Nakajima T, Yoshie H, et al. Effect of periodontal treatment on the C-reactive protein and proinflammatory cytokine levels in Japanese periodontitis patients. *J Periodontal Res* 2005;**40**(1):53-58.
18. Chen YW, Umeda M, Nagasawa T, Takeuchi Y, Huang Y, Inoue Y, et al. Periodontitis may increase the risk of peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008;**35**(2):153-158.
19. Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol* 2010;**81**(1):89-98.
20. Salazar MG, Jehmlich N, Murr A, Dhople VM, Holtfreter B, Hammer E, et al. Identification of periodontitis associated changes in the proteome of whole human saliva by mass spectrometric analysis. *J Clin Periodontol* 2013;**40**(9):825-832.
21. 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**(6):893-899.
22. 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**(2):184-191.

23. Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Parada CA, Casati MZ, Nociti FH, Jr. Overexpression of interleukin-1beta and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Periodontal Res* 2007;**42**(4):377-381.
24. 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**(1):99-108.
25. 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):42-47.
26. 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):4005-4014.
27. 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):865-871.
28. 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):154-160.
29. Souto GR, Queiroz CM, Jr., Costa FO, Mesquita RA. Relationship between chemokines and dendritic cells in human chronic periodontitis. *J Periodontol* 2014;**85**(10):1416-1423.
30. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* 1993;**28**(6 Pt 2):500-510.

31. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol* 1993;**64**(5 Suppl):456-460.
32. Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J Periodontol* 1998;**69**(10):1139-1147.
33. 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.
34. Jacob PS, Nath S. Evaluation of interleukin-1beta and 8 in gutka chewers with periodontitis among a rural Indian population. 2014;**44**(3):126-133.
35. Jin L, Soder B, Corbet EF. Interleukin-8 and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid in relation to periodontopathogens in untreated adult periodontitis. *J Periodontol* 2000;**71**(6):929-939.
36. Mathur A, Michalowicz B, Castillo M, Aeppli D. Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res* 1996;**31**(7):489-495.
37. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol* 1995;**66**(10):852-859.
38. Tymkiw KD, Thunell DH, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, et al. Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2011;**38**(3):219-228.

39. Khalaf H, Lonn J, Bengtsson T. Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: possible role for TGF-beta1 as a marker for disease progression. *Cytokine* 2014;**67**(1):29-35.
40. Lisa Cheng YS, Jordan L, Gorugantula LM, Schneiderman E, Chen HS, Rees T. Salivary interleukin-6 and -8 in patients with oral cancer and patients with chronic oral inflammatory diseases. *J Periodontol* 2014;**85**(7):956-965.
41. Michiels K, Schutyser E, Conings R, Lenaerts JP, Put W, Nuyts S, et al. Carcinoma cell-derived chemokines and their presence in oral fluid. *European journal of oral sciences* 2009;**117**(4):362-368.
42. Teles RP, Likhari V, Socransky SS, Haffajee AD. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *J Periodontal Res* 2009;**44**(3):411-417.
43. 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 of inflammation* 2012;**2012**:846052.
44. Zhang J, Dong H, Kashket S, Duncan MJ. IL-8 degradation by Porphyromonas gingivalis proteases. *Microb Pathog* 1999;**26**(5):275-280.
45. Lamster IB, Oshrain RL, Gordon JM. Enzyme activity in human gingival crevicular fluid: considerations in data reporting based on analysis of individual crevicular sites. *J Clin Periodontol* 1986;**13**(8):799-804.
46. Chapple IL, Matthews JB, Thorpe GH, Glenwright HD, Smith JM, Saxby MS. A new ultrasensitive chemiluminescent assay for the site-specific quantification of alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res* 1993;**28**(4):266-273.

47. Tsuchida K, Hara K. Clinical significance of gingival fluid measurement by "Periotron". *J Periodontol* 1981;**52**(11):697-700.
48. Moher D, Cook DJ, Eastwood S, Olkin I, Rennie D, Stroup DF. Improving the quality of reports of meta-analyses of randomised controlled trials: the QUOROM statement. Quality of Reporting of Meta-analyses. *Lancet* 1999;**354**(9193):1896-1900.

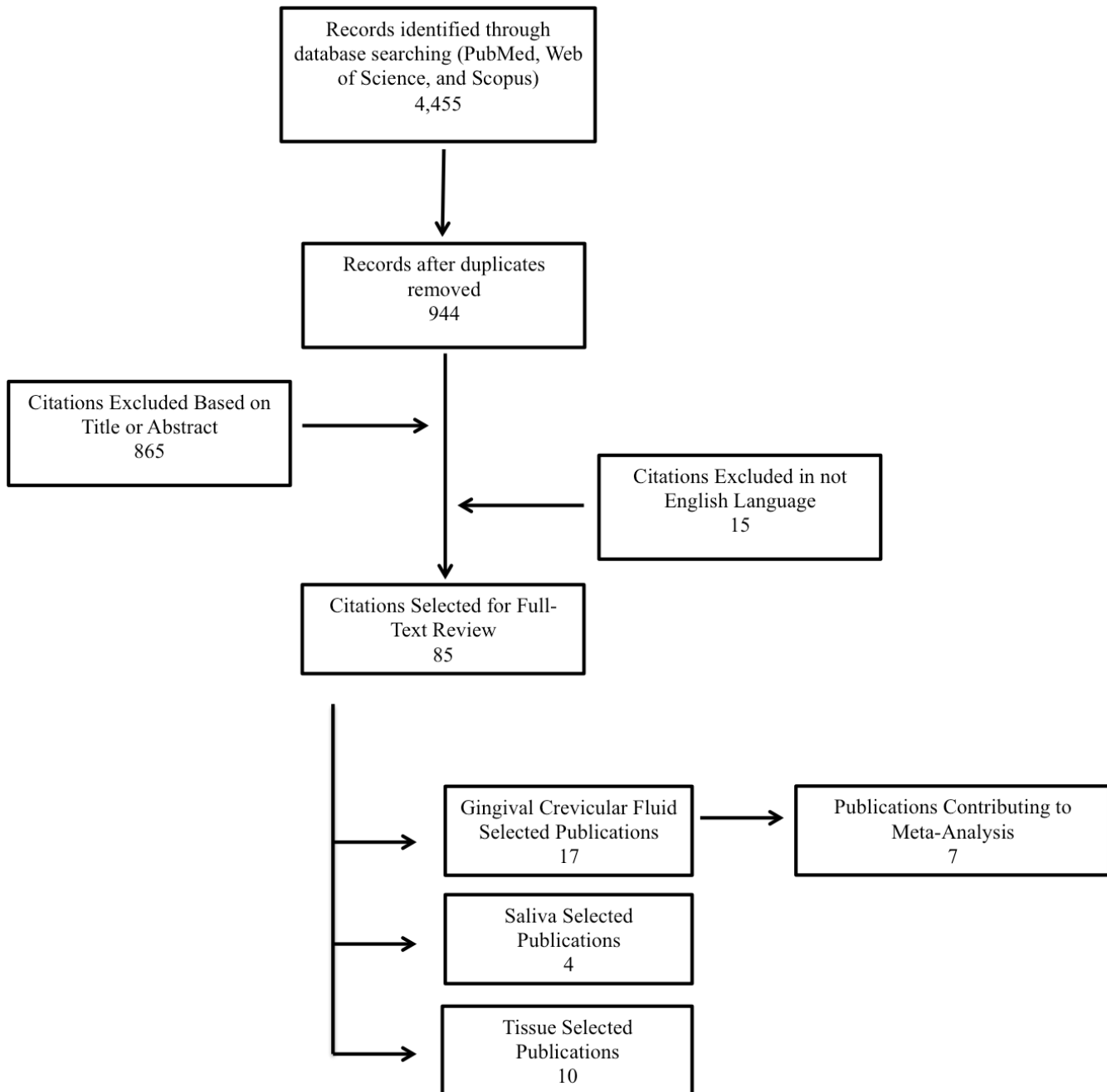
FIGURES

Figure 1. Flow-chart outlining the search and the results obtained at different stages of this study

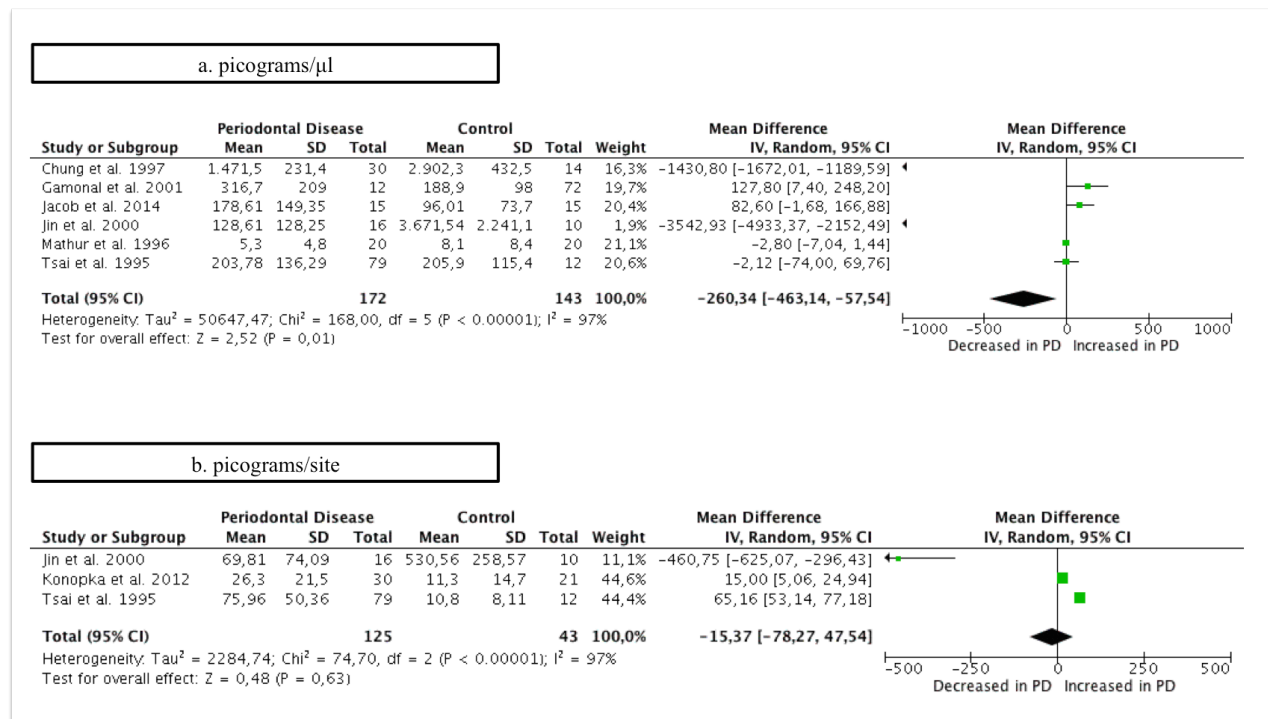


Figure 2. Meta-analysis forest plots of IL-8 levels in patients with and without chronic periodontitis. The forest plot is a graphical depiction of the individual results that contributed to meta-analyses. The study results contributing to the meta-analyses were divided into groups according to the unit of measure used for the studies data. a. picograms/ μ l unit b. picograms/site unit

Table 1: Characteristics of the studies included – Systematic Review

Gingival fluids						
Author Year	Total Subjects	N (mean age in years)	Criteria for subjects selection			Levels of IL8
			Control Subjects	Diseased Subjects	Evaluation Method	
Chung 1997	44	Control Group (27.7) Study Group (41.0)	No sites with: CAL $\geq$ 5mm or PPD $\geq$ 5mm	To have at least 4 sites with: CAL $\geq$ 5mm and PPD $\geq$ 3mm	ELISA	Lower in diseased subjects
Cosgarea 2012	24	Control Group (30.4) Study Group (53.8)	No sites with: CAL $\geq$ 4mm or PPD $\geq$ 4mm	Classification of periodontal disease using criteria provided by The American Academy of Periodontology	ELISA	Lower in diseased subjects
Ertugrul 2013	42	Control Group (32.8) Study Group (35.1)	No CAL > 2mm or PPD > 3mm, BOP at <15% of sites, no horizontal or vertical bone loss in the radiographic examinations	To have at least 4 teeth with: CAL $\geq$ 4 mm and PPD $\geq$ 5 mm; Vertical and horizontal bone loss in the radiographic examinations	ELISA	Higher in diseased subjects
Gamonal 2001	18	Control Group (40.16) Study Group (47.16)	No sites with: CAL $\geq$ 5mm or PPD $\geq$ 5mm	To have at least 14 natural teeth excluding third molars and 5 to 6 teeth with: CAL $\geq$ 3mm and PPD $\geq$ 6mm	ELISA	Higher in diseased subjects
Giannopoulou 2003	40	Control Group (38.0) Study Group (52.0)	NI	To have at least 8 sites with: CAL > 5mm and radiographic evidence of bone loss	ELISA	Higher in diseased subjects
Guentsch 2014	30	Control Group (26.0) Study Group (52.0)	All CAL = 0mm and PPD $\leq$ 3 mm	To have at least 30% of sites with: PPD $\geq$ 5 mm and present an age of $\geq$ 35 years	ELISA	Higher in diseased subjects

Holzhausen 2010	80	Control Group (32.1) Study Group (45.0)	All CAL = 0mm and PPD $\leq$ 3 mm, no BOP	To have at least 2 sites wit: CAL $\geq$ 4mm, PPD $\geq$ 6 mm, and BOP	ELISA	Higher in diseased subjects
Jacob 2014	30	Control Group (28.3) Study Group (42.9)	No sites with: CAL $\geq$ 4mm or PPD $\geq$ 4mm	Based on the current classification of the American Academy of Periodontology	ELISA	Higher in diseased subjects
Jin 2000	26	NI	No sites with: CAL $\geq$ 1mm or PPD $\geq$ 4mm, or signs of bone loss on radiographs	To have at least 2 teeth per quadrant with: CAL $\geq$ 3mm, PPD $\geq$ 5mm, and radiographic evidence of alveolar bone loss	ELISA	Lower in diseased subjects
Khalaf 2014	60	Control Group (55.2) Study Group (54.5)	Infrequent occurrence of PPD $\geq$ 4 mm and no bone loss on radiographs	To have at least five sites with: PPD 4–6 mm or > 6 mm, a BOP score exceeding five percent, and radiographs showing generalized bone loss	ELISA	Higher in diseased subjects
Konopka 2012	51	Control Group (33.7) Study Group (48.7)	Present mean whole- mouth CAL $\leq$ 1 mm and no radiographic evidence of alveolar bone loss	Based on the current classification of the American Academy of Periodontology	ELISA	Higher in diseased subjects
Luo 2011	30	NI	NI	Visible plaque index, gingival bleeding, retentive calculus, PPD and radiographic bone loss detected by orthopantomograms	ELISA	Lower in diseased subjects
Lutfioglu 2015	30	Control Group (29.2) Study Group (45.1)	NI	To fave at least 8 teeth with: PPD $\geq$ 5 mm, and radiographic evidence of alveolar bone and attachment loss	ELISA	Higher in diseased subjects

Mathur 1996	40	Control Group (35.9) Study Group (50.9)	NI	Periodontal disease status was determined from previous clinical and radiographic records.	ELISA	Lower in diseased subjects
Teles 2010	40	Control Group (38.0) Study Group (55.0)	To have at least 24 teeth with: CAL < 2mm and PPD < 3 mm	To have at least 20 teeth, and 8 sites with: CAL > 4 mm and PPD > 2 mm	Checkerboard Immunoblotting	Higher in diseased subjects
Tsai 1995	21	Control Group (27.2) Study Group (39.8)	NI	NI	ELISA	Higher in diseased subjects
Tymkiw 2011	32	Control Group (51.2) Study Group (61.2)	Clinical attachment level and probing depth ≤ 3 mm and bleeding on probing at $\leq 10\%$ of sites	> 30% of sites with a clinical attachment level and probing depth ≥ 5 mm	Luminex	Higher in diseased subjects

Gingival tissue

Author Year	Total Subjects	N (mean age in years)	Criteria for subjects selection		Evaluation Method	Levels of IL8
			Control Subjects	Diseased Subjects		
Andia 2011	24	Control Group (37.2) Study Group (44.0)	No sites with: CAL ≥ 3 mm and PPD ≥ 3 mm	Based on the current classification of the American Academy of Periodontology	qRT-PCR	Higher in diseased subjects
Cesar-Neto 2007	35	Control Group (40.5) Study Group (49.5)	No sites with: PPD ≥ 3 mm an BOP	Sites with: PPD ≥ 7 mm and BOP	qRT-PCR and ELISA	Higher in diseased subjects
Correa 2012	60	Control Group (40.5) Study Group (45.5)	NI	To have at least 4 sites and more than 2 teeth in each quadrant with: CAL > 5mm and PPD > 6 mm	ELISA	Higher in diseased subjects

Duarte 2007	30	Control Group (38.5) Study Group (49.5)	No sites with: PPD ≥ 3 mm and BOP	To have sites with: PPD ≥ 5 mm and BOP	qRT-PCR	Higher in diseased subjects
Matsuki 1992	22	NI	NI	Patients with moderate to severe periodontitis	<i>In situ</i> hybridization and immunohistochemistry	Higher in diseased subjects
McGee 1998	24	NI	No sites with: PPD ≥ 3 mm an BOP	Based on the current classification of the American Academy of Periodontology	ELISA and immunohistochemistry	Higher in healthy gingiva
Sfakianakis 2002	12	NI	Sites with non-inflamed gingiva	Patients with diagnosis of periodontitis	Immunohistochemistry	Found in healthy and disease tissue
Souto 2014	33	All individuals (46)	NI	To have at least 2 nonadjacent teeth with: CAL ≥ 3 mm	Immunohistochemistry	Higher in advanced disease
Tonetti 1994	18	NI	No sites with CAL ≥ 2 mm and PPD ≥ 2 mm	To heve sites with: CAL > 4 mm, PPD = 4 to 5 mm, and BOP	<i>In situ</i> hybridization and immunohistochemistry	Found in healthy and disease gingiva
Venza 2010	60	All individuals (62.1)	NI	Based on the current classification of the American Academy of Periodontology	qRT-PCR and Western Blot	Higher in diseased subjects

Saliva

Criteria for subjects selection

Author Year	Total Subjects	N (mean age in years)	Control Subjects	Diseased Subjects	Evaluation Method	Levels of IL8
Cheng 2014	42	Control Group (62.95) Disease Group (61.86)	No evidence of moderate, or severe periodontitis	Minimum of moderate periodontitis: ≥ 2 interproximal sites with CAL ≥ 4 mm (not on same tooth), or ≥ 2 interproximal sites with PPD ≥ 5 mm (not on same tooth)	ELISA	Higher in control subjects (ns)
Khalaf 2014	60	Control Group (55.2) Disease Group (54.5)	No bone loss found on radiographs and infrequent occurrence of PD $\nless 4$ mm	Radiographs showing generalized bone loss exceeding one-third of the root length on a majority of teeth, clinical presence of at least five sites with PPD ≥ 4 and BOP score $> 5\%$	ELISA	Higher in control subjects (s)
Michiels 2009	31	Control Group (28) Disease Group (53)	NI	NI	ELISA	Higher in diseased subjects (ns)
Teles 2009	118	Control Group (31) Disease Group (50)	At least 20 natural teeth and no pocket depth or CAL > 3 mm	At least 20 natural teeth and eight or more sites with PPD > 4 mm and CAL > 3 mm	Luminex	Higher in diseased subjects (ns)

NI: not informed

CAL: Clinical Attachment Loss

PPD: Probing Pocket Depth

CAPÍTULO 2

Functional analysis of differences in transcriptional activity conferred by haplotypes in the *Interleukin 8* gene

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

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

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

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

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

BACKGROUND: The host immune response triggered by periodontopathogens is variable, determined in part by environmental influences and partly by individual genetic load. We previously demonstrated that polymorphisms in the *Interleukin 8 (IL8)* gene, forming the ATC/TTC haplotype conferred two-fold susceptibility to chronic periodontitis. Knowledge of the potential role of this *IL8* haplotype in the gene expression regulation is required. The functional analysis of the transcriptional activity conferred by *IL8* haplotypes was investigated here through in vitro controlled assays.

METHODOLOGY: Twelve patients carrying the ATC/TTC or ATT/TTC *IL8* haplotypes were recruited and their peripheral blood was collected to separate neutrophils, monocytes and T cells by utilizing the Histopaque-1077/ 1119 gradient and magnetic beads. The respective cells cultured were stimulated for 4 hours with phorbol myristate acetate (PMA), Interleukin-1 β , *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) or medium only (control). Total RNA was extracted from each cell type to investigate by RT-qPCR the mRNA levels of the *IL4*, *IL8*, *IL12* and Tumor Necrosis Factor alpha (*TNFA*) genes. **RESULTS:** Mainly, neutrophils and T cells stimulated with *Aa* and *Pg* increased the *TNFA* and *IL8* mRNA levels when carrying the ATC/TTC in comparison with the other *IL8* haplotype. **CONCLUSION:** The ATC/TTC haplotype in the *IL8* gene previously associated with susceptibility to chronic periodontitis, under periodontopathogens stimuli, modulated the *IL8* transcriptional activity in the neutrophils and T cells. This demonstrates the functional role of this haplotype and might biologically explain our previous findings.

INTRODUCTION

Chronic periodontitis (CP) is a infectious inflammatory disease characterized by the destruction of the tooth-supporting structures (1). This destruction results from an imbalance between the levels of potentially pathogenic bacteria in dental plaque and the immunological potential of the host (2, 3). Periodontopathogens, such as *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* (called the red complex) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* were highly associated with subgingival biofilms at periodontitis-affected sites (1), and triggers the innate host response through Toll-like receptors (TLRs) expression by resident cells and leukocytes in the periodontal environment (4). After TLR activation, it is initiated the activation of several transcription factors stimulating the production of inflammatory cytokines (5-7). These cytokines seem to play an important mediating role controlling cellular interactions and functions. In this sense some of them guide neutrophils migration to the gingival crevicular fluid (GCF) (8), and under continued presence of periodontopathogens, an inflammatory infiltrate consisting predominantly of lymphocytes (T-cells) and macrophages become prevalent (9).

Although every triggered by periodontopathogens, the host immune response is variable, determined in part by environmental influences (10-12) and partly by individual genetic load (13). The relative contribution of the genetic factor to clinical measures of periodontal disease have been proved in mainly in monozygotic twins, even after adjustments for behavioral variables including smoking (14). Furthermore, once differences in levels of interleukins can be attributed to polymorphisms in their encoding genes (15), genetic susceptibility to periodontal disease has been demonstrated with

regard to genes of the immune system (16, 17). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the more abundant genetic variation in the human genome (18).

The association between SNPs and periodontitis is well-documented (19-21). In particular, we previously found that the -251(T/A) (rs4073), +396(T/G) (rs2227307) and +781(C/T) (rs2227306) SNPs in the *IL8* gene, forming the haplotype ATC/TTC, conferred two-fold greater susceptibility to CP (odds ratio_{adjusted} = 2.24, 95% confidence interval = 1.10-4.55) than the other haplotypes such as the ATT/TTC (22). Following clinical studies have investigated whether the ATC/TTC *IL8* haplotype could influence the levels of infection by periodontopathogens (23) and the production of the IL-8 chemokine (24). This investigation was also executed in regard to the outcomes of the non-surgical periodontal therapy (25, 26). The main findings were that in spite of no difference was found in the IL-8 production between the different *IL8* haplotypes (24), periodontal destruction may occur even with a lower microbial challenge because of the presence of the ATC/TTC *IL8* haplotype, the genetic background associated with susceptibility to CP (23).

Therefore, the biological explanation of the specific role of *IL8* haplotypes in the regulation of gene expression is required. Therefore, the aim of this study is to investigate the functionality of the *IL8* haplotypes previously associated with CP, focusing on its potential influence in the transcriptional activity utilizing in vitro controlled assays.

MATERIAL AND METHODS

Patients

First, individuals carrying the ATT/TTC or ATC/TTC *IL8* haplotypes were confirmed by sequencing, and after they were informed about the aims and methods of the current study, they gave their written consent to participating in this study. The human subjects protocol was approved by the ethics committee at UNESP- Universidade Estadual Paulista (CAAE 18527813.7.0000.5416). The following exclusion criteria were applied: smoking, a history of systemic or local disease with an influence on the immune system (cancer, cardiovascular, and respiratory diseases), diabetes mellitus, hepatitis or human immunodeficiency virus (HIV) infection, immunosuppressive chemotherapy, or current pregnancy or lactation. Twelve patients were recruited once the sample size calculation resulted in a total sample size of six subjects for 95% power study.

Blood samples

Patients' peripheral blood (20mL) was drawn into a Vacutainer blood collecting tube (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) with EDTA/K3 as the anticoagulant. According to the Sigma procedure, the separation of nucleated cells was performed by a double gradient of 3 ml of Histopaque-1077 over an equal volume of Histopaque-1119 (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Six milliliters of blood at room temperature was carefully layered onto the low gradient solution. After centrifugation (30 minutes at 700g at room temperature), two distinct cell layers were distinguished. The plasma 1077 layer (upper fraction) was discarded. The 1119/1077 layer (bottom fraction

containing neutrophils) and the intermediate fraction between these 2 layers containing PBMC were removed by gentle aspiration with a siliconized Pasteur pipet, placed into separate tubes, and washed twice with sterile phosphate-buffered sodium chloride solution (PBS). The neutrophils suspension was then centrifuged. The supernatant was decanted and the neutrophil pellet resuspended in RPMI 1640 medium, supplemented with L-glutamine and 1% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS).

Isolation of monocytes and lymphocytes

After PBS washing, PBMCs were resuspended in isolation buffer [PBS 0.1% (w/v) BSA and 2 mM EDTA] and split into two solutions. In one of them monocytes were isolated from PBMCs using the Dynabeads untouched human monocytes kit (cat. no. 11350D, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). One hundred microliters antibody mix and 100µl blocking reagent were mixed and incubated for 20 min at 4°C. The cells were centrifuged 5 min at 350g at 4°C. The supernatant was discarded, the cells pellet resuspended in 500µl isolation buffer, and 500µl prewashed Dynabeads were added and incubated 15 min at 4°C. Then, 1 ml isolation buffer was added and the mixture placed in the magnet rack (cat. no. 123-02D, Invitrogen). The supernatant, which contains the untouched monocytes, was harvested. In another solution, lymphocytes were isolated from PBMCs using the Dynabeads untouched human T Cells (cat. no. 11344D, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Similarly as described for isolating monocytes, 1×10^7 PBMCs (in 1 ml isolation buffer) were added to 100µl prewashed Dynabeads, mixed and incubated for 15 min at room temperature. The suspension was placed in the magnet rack, and the supernatant, which contained lymphocytes, was harvested.

Cell Culture

The cell viability was determined by staining with trypan blue, and vital cells were counted in a Neubauer chamber. The respective cell number was adjusted and they were cultured at the concentration of 2×10^6 cells per mL. All cells were cultured overnight in RPMI 1640 supplemented with L-glutamine and 1% heat-inactivated FBS in 24-well plates (Costar, Corning, NY) at 37°C in a 5% CO₂ environment. Lymphocytes were activated with Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies, 11131D) during 7 hours following manufacturers' recommendations.

Bacterial growth conditions

Frozen stocks of *Porphyromonas gingivalis* (Pg) ATCC 33277 strain were cultured in agar plates of Tryptic Soy Agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood, 0.5 mg/mL hemin and 1 mg/mL menadione. Frozen stocks of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) JP2 strain were culture in 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 were harvested from both cultures at the mid-logarithmic phase of growth.

Stimulation of Neutrophils, Monocytes and Lymphocytes

The cells cultured at a concentration of 1×10^6 cells/well in a 24-well culture plate were stimulated for 4 hours with 50 ng/mL of phorbol myristate acetate (PMA - Sigma-Genosys), 5 ng/mL of Interleukin-1 β , *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or medium only (control). Bacterial stimuli were performed at a

multiplicity of infection (MOI) 1:100 (cells:bacteria).

Quantitative real-time RT-PCR:

After stimulation, cells were lysed directly with 200µl of lysis buffer using an RNAqueous kit (Ambion Inc., Austin, Tex.). Total RNA was extracted according to the manufacturer's protocols. The RNA pellet was resuspended in 20µl of RNA storage buffer. RNA integrity and quantity were checked by spectrometry with a NanoVue spectrophotometer (GE Healthcare, Munich, Germany). Five micrograms of total RNA was used for cDNA synthesis with the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Real-time PCR was performed using the cDNA with TaqMan assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) of *IL4*, *IL8*, *IL12* and *TNFA* and *GAPDH* as endogenous control on the StepOne Plus system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) in the presence of TaqMan DNA polymerase. The data were analyzed by DDCT method normalizing mRNA level to mRNA control condition (non stimulus).

Statistical Analysis:

Raw data were analyzed using the GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). The Kolmogorov-Sminov test was used to assess the distribution normality of quantitative data. Because the values were distributed normally, the unpaired t-test was used to assess differences between groups. Because of the presence of a normal distribution, the unpaired t-test was used to compare the gene expression in the groups composed of individuals carrying the different *IL8* haplotypes. Statistical differences were considered significant at the $p < 0.05$ level and indicated by an asterisk ($p < 0.05$ (*)).

RESULTS

Following we presented the expression results of the investigated genes according to each cell type and stimuli. The expression of *IL8* and *TNFA* on T cells was lower compared to the neutrophils and monocytes. The lowest *IL4* expression levels were found in the monocytes, as well as the *IL12* in the neutrophils.

Neutrophils

In the neutrophils the expression levels of *IL4* were similar between the ATC/TTC haplotype compared to the ATT/TTC haplotype for any performed stimulus (Figure 1). The *IL12* gene expression was lower after all stimuli compared to control. Considering the genes investigated, the highest expression levels found in the neutrophils were the *IL8*. This was observed particularly with the *Aa* and *Pg* stimuli, which increased *IL8* mRNA production in comparison to the control condition. Furthermore, we detected significant higher *IL8* gene expression for the ATC/TTC haplotype compared to ATT/TTC haplotype (Figure 1). The *TNFA* gene also had increased expression when neutrophils were submitted to microbial stimuli in comparison to the control condition. However, there was no statistical significant difference between the groups with different haplotypes.

Monocytes

In the monocytes low expression of *IL4* and *IL12* genes were detected (Figure 2). There was no statistical difference between the ATC/TTC *IL8* haplotype compared to the other haplotype for any performed stimulus for both investigated genes. In addition, *IL4* and

IL12 expression under all stimuli conditions were similar to their respective expression without stimulus. There was higher *IL8* gene expression in the monocytes, mainly with the IL1- β and microbial stimuli (Figure 2). The ATC/TTC haplotype presented higher *IL8* expression compared to the ATT/TTC haplotype, although without significant statistical difference. Similar results were observed concerning the *TNFA* mRNA levels, confirming the effectiveness of direct *Aa* and *Pg* bacteria stimulation in this cell type.

T Lymphocytes

In the T cell type, in regard to the *IL4* gene expression there was no statistical difference between the investigated *IL8* haplotypes for any performed stimulus (Figure 3). Conversely, under microbial stimuli, significant higher *IL8* gene expression was found in the ATC/TTC haplotype compared to the other haplotype (Figure 3B). Moreover, significant higher *TNFA* expression was observed for the ATC/TTC haplotype under PMA, *P.g.* and *A.a.* stimulus. Interestingly, the ATT/TTC *IL8* haplotype was the only detected associated with higher expression of the *IL12* gene in comparison with the ATC/TTC haplotype.

DISCUSSION

In this study, we verified the functional role of the ATC/TTC *IL8* haplotype previously associated with susceptibility to CP in the transcriptional activity of innate and adaptive immune system cells challenged by *Aa* and *Pg* periodontopathogens. For analysis of the innate immune response human neutrophils were isolated from peripheral blood, while for evaluating the adaptive immune response T cells were separated from

PBMC. The stimuli with PMA and IL-1 were performed as a positive control once they are potent activators of major signaling pathways of the studied cytokines. The stimuli by using co-culture with *Pg* and *Aa* were also performed due to the fact that periodontal pathogens are important in periodontal disease, colonizing the tooth surfaces and the inner epithelium of the gingival sulcus (27).

It was observed for all cell types assessed, that the *IL8* gene expression was detected at high levels when stimulated with *Aa* and *Pg*, particularly in the neutrophils. This occurs because the neutrophils provide the first line of defense against periodontal pathogens colonization by the production of inducible mediators such as pro-inflammatory cytokines (28). Especially IL-8 mediates the neutrophils migration and activation of peripheral blood to the tissue. Therefore the IL-8 has pro-inflammatory function (29). Some studies evaluated the expression of this gene in other cell types related to periodontal disease and showed results in agreement to the found here. After 3 hours of the presence of the “red complex” bacteria in epithelial cells there was up-regulation of expression of the IL-8 gene (30). Specifically related to the *Aa* challenge, primary cultures of human gingival epithelial cells cultured in the presence of this microorganism showed elevated *IL8* mRNA levels (31). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS upregulated the *IL8* gene expression in PBMC (32), similarly as reported by Agarwal et al. (33).

Concerning *TNFA*, increased mRNA levels were found mainly in neutrophils and monocytes stimulated with *Aa* and *Pg*. TNF- α is a potent pro-inflammatory cytokine that up regulates the production of collagenases, prostaglandins, chemokines and cytokines, cell adhesion molecules and bone resorption-related factors (34, 35). It was reported that

the H400 oral epithelial cell line was challenged by non-viable *Pg*, gene leading to the up-regulation of the *TNFA* transcripts at 4h and 24h post-stimulation (36).

Whereas the Interleukin-8 and TNF- α previously discussed exhibit an innate immune profile, the IL-12 also evaluated in this study is more related to the adaptive immune response. IL-12 has a pivotal function in the initiation and regulation of cellular immune responses. Hence an investigation regarding the response of human dendritic cells to *Aa* and *Pg* stimulation reported that *Aa* stimulated dendritic cells to express *IL12* at lower bacterial concentrations than *Pg* (37). It is noteworthy that IL-12 has been well characterized as a suppressor of Th2 cytokines, such as IL-10 and IL-4 (38). It is in agreement with our findings, since in the monocytes *IL12* transcriptional levels were higher compared to neutrophils (innate immune cell), while there was almost no *IL4* expression.

In general, we observed low *IL4* gene expression even under stimulation conditions. This occurs due to IL-4, secreted from T helper-2 subsets, as opposed to the destructive pathway triggered by pro-inflammatory cytokines have marked suppressive and anti-inflammatory properties regulating of the synthesis of pro-inflammatory mediators (39). Thereby, findings from an *in vitro* study wherein gingival fibroblasts isolated from healthy and periodontitis affected subjects stimulated with *Pg* have shown higher IL-4 expression in the healthy group compared with periodontitis group (40). This is in agreement with the Shapira's hypothesis that low levels or the absence of IL-4 triggers periodontitis (41).

Similar as the present study, the functionality of polymorphisms have been investigated. The effect of *IL12RB2* polymorphisms in the expression of the gene was

estimated using the luciferase reporter gene assay in Jurkat T cells. This assay revealed that specific SNPs affected the *IL12RB2* gene expression (42). Closer to the gene of our interest, a recent study examined the transcriptional activation and mediation of the -845 SNP in the *IL8* promoter, indicating that the -845T allele was approximately 9-fold higher than the -845C allele (43). Also illustrating the biological relevance of the *IL8* gene, another study investigated the functional role of another SNP in this gene (44). The -251 SNP (rs4073T>A), the same which comprises the first position of the presently investigated *IL8* haplotype, was investigated by luciferase activity and revealed that the -251TT genotype was associated with significantly higher *IL8* expression than the -251AA genotype (44). In contrast, Hull et al. 2000 firstly investigated the -251 SNP, and they found that the A allele tended to be associated ($p = 0.07$) with higher IL-8 production in whole blood stimulated with *Escherichia coli* 055:B5 LPS (45). This finding was not confirmed by Hacking et al. 2004, who found no significant difference between the -251A and -251T plasmid constructs in the expression pattern of primary respiratory epithelial cells following TNF-stimulation (46). The functional role of the second SNP, the +396 (rs2227307), has not been investigated, to our knowledge. Regarding the third SNP, +781 (rs2227306), Hacking et al. (2004) observed that C/EBP b (CCAAT/enhancer binding protein-beta), which is part of a transcription factor binding complex, preferentially bound in the presence of the -781T allele in respiratory epithelial cells (46). Those authors thought that the effect of particular polymorphisms on mRNA abundance appeared to be cell-specific, as it was observed in primary respiratory epithelial cells but not in primary lymphocyte cells. This present study is the first to investigate functional role of three SNPs in the *IL8* gene, forming the mentioned

haplotypes. Haplotypes are more powerful for detecting susceptibility alleles than individual polymorphisms, and they may give more information about the basis of the disease (22). We made this study utilizing in vitro controlled assays with freshly isolated human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells from patients carrying ATT/TTC and ATC/TTC *IL8* haplotype challenged by stimuli as near as the natural periodontitis infection. Consequently, we observed after stimulation with microorganisms higher expression of pro-inflammatory cytokines from cells belonged to patients carrying the ATC/TTC *IL8* haplotype compared to the ATT/TTC haplotype. This could be noted especially in neutrophils and T lymphocytes for the *IL8* gene expression and in T cells for the *TNFA* gene expression.

In conclusion the haplotypes formed by polymorphisms in *IL8* gene previously associated with susceptibility to chronic periodontitis influence gene expression under bacterial stimuli. This present in vitro controlled assay demonstrates the functional role of this haplotype and might biologically explain our previous findings of association and clinical studies.

REFERENCES

1. Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral microbiology and immunology* 2009;**24**(6):469-477.

2. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2008;**35**(2):89-105.
3. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontology 2000* 2010;**52**(1):163-206.
4. Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology 2000* 2007;**43**:41-55.
5. Nakamura H, Fukusaki Y, Yoshimura A, Shiraishi C, Kishimoto M, Kaneko T, et al. Lack of Toll-like receptor 4 decreases lipopolysaccharide-induced bone resorption in C3H/HeJ mice in vivo. *Oral microbiology and immunology* 2008;**23**(3):190-195.
6. Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Garlet TP, Cestari TM, Lima HR, et al. The role of toll-like receptor 2 in the recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 2009;**80**(12):2010-2019.
7. Lima HR, Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Torres SA, Santos CF, et al. The essential role of toll like receptor-4 in the control of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *J Clin Periodontol* 2010;**37**(3):248-254.
8. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of applied oral science : revista FOB* 2015;**23**(3):329-355.
9. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 2002;**13**(1):17-34.

10. Johnson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. *J Dent Educ* 2001;**65**(4):313-321.
11. Linden GJ, Mullally BH, Freeman R. Stress and the progression of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1996;**23**(7):675-680.
12. Mealey BL. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. *Compend Contin Educ Dent* 2000;**21**(11):943-946, 948, 950, passim; quiz 956.
13. Michalowicz BS, Ronderos M, Camara-Silva R, Contreras A, Slots J. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. *J Periodontol* 2000;**71**(6):981-988.
14. 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):1699-1707.
15. Stern DL. Evolutionary biology. The problem of variation. *Nature* 2000;**408**(6812):529, 531.
16. Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005;**32 Suppl 6**:159-179.
17. Shapira L, Wilensky A, Kinane DF. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol* 2005;**32 Suppl 6**:72-86.
18. 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):928-933.

19. Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;**14**(6):430-449.
20. Kinane DF, Shiba H, Stathopoulou PG, Zhao H, Lappin DF, Singh A, et al. Gingival epithelial cells heterozygous for Toll-like receptor 4 polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile are hypo-responsive to *Porphyromonas gingivalis*. *Genes Immun* 2006;**7**(3):190-200.
21. Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol* 2000 2005;**39**:91-117.
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. *Biochem Genet* 2011;**49**(5-6):292-302.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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. *J Periodontal Res* 2014;**49**(4):489-498.

27. 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):412-421.
28. 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**(12):1349-1363.
29. 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**(4):1045-1049.
30. 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).
31. Laube DM, Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Eskdale J, Gallagher G, Diamond G. Differential regulation of innate immune response genes in gingival epithelial cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* 2008;**43**(1):116-123.
32. Sfakianakis A, Barr CE, Kreutzer D. Mechanisms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced expression of interleukin-8 in gingival epithelial cells. *J Periodontol* 2001;**72**(10):1413-1419.
33. Agarwal S, Piesco NP, Johns LP, Riccelli AE. Differential expression of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *Journal of dental research* 1995;**74**(4):1057-1065.

34. Wajant H, Pfeffer K, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factors in 1998. *Cytokine & growth factor reviews* 1998;**9**(3-4):297-302.
35. 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**(3):127-131.
36. Milward MR, Chapple IL, Wright HJ, Millard JL, Matthews JB, Cooper PR. Differential activation of NF-kappaB and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens. *Clinical and experimental immunology* 2007;**148**(2):307-324.
37. Vernal R, Leon R, Herrera D, Garcia-Sanz JA, Silva, Sanz M. Variability in the response of human dendritic cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* 2008;**43**(6):689-697.
38. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003;**19**(5):641-644.
39. te Velde AA, Huijbens RJ, Heije K, de Vries JE, Figdor CG. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood* 1990;**76**(7):1392-1397.
40. Baek KJ, Choi Y, Ji S. Gingival fibroblasts from periodontitis patients exhibit inflammatory characteristics in vitro. *Arch Oral Biol* 2013;**58**(10):1282-1292.
41. Shapira L, van Dyke TE, Hart TC. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. *Medical hypotheses* 1992;**39**(4):319-322.
42. Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K, Namisato M, Fukutomi Y, Nishimura F, et al. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor beta2 gene partially

determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *Journal of clinical pathology* 2005;**58**(7):740-743.

43. Imamura Y, Fujigaki Y, Higaki K, Yoshinari N, Wang P-L. 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. *Journal of Hard Tissue Biology* 2012;**21**(4):427-433.

44. 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.

45. 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):1023-1027.

46. 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**(4):274-282.

Neutrophils

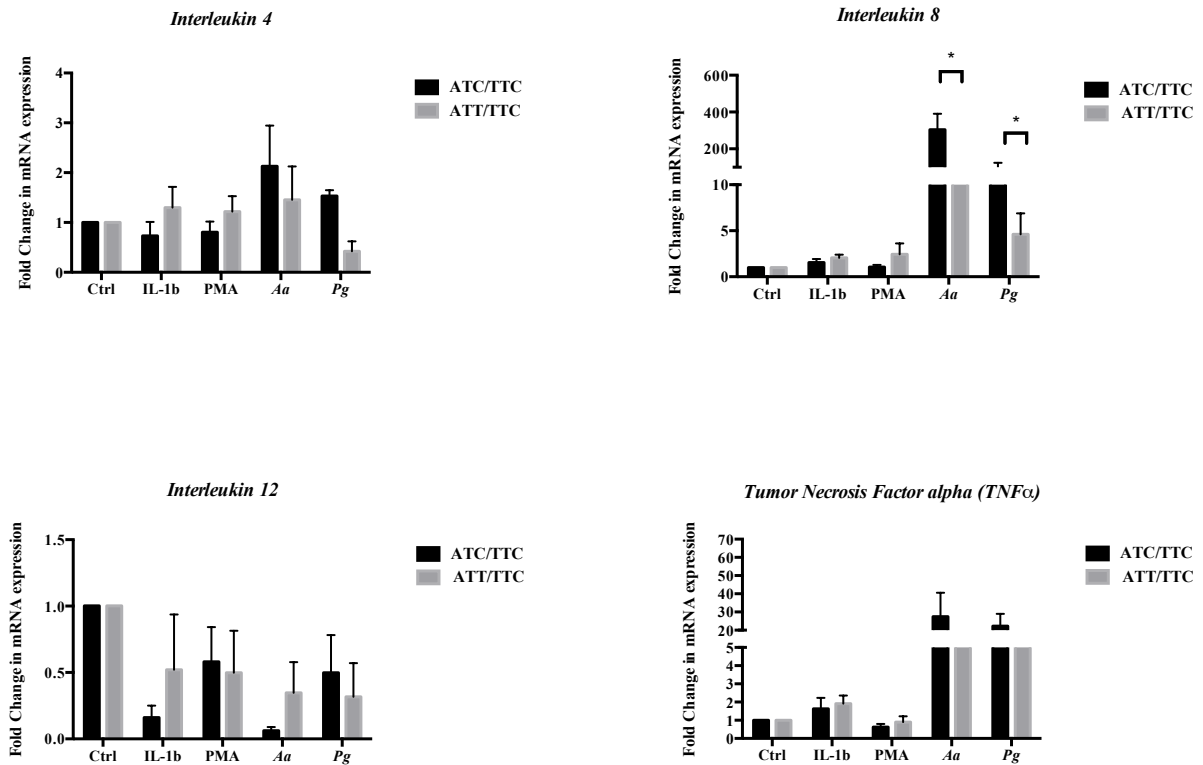


Figure 1: RT-qPCR of neutrophils from patients carrying ATC/TTC and ATT/TTC haplotype. Neutrophils were isolated from peripheral blood and then stimulated in the presence of immune response inducers (PMA and IL-1 β) and the pathogens commonly found in periodontal disease (Aa and Pg). Bars indicate mean and standard deviation of the normalized gene expression.

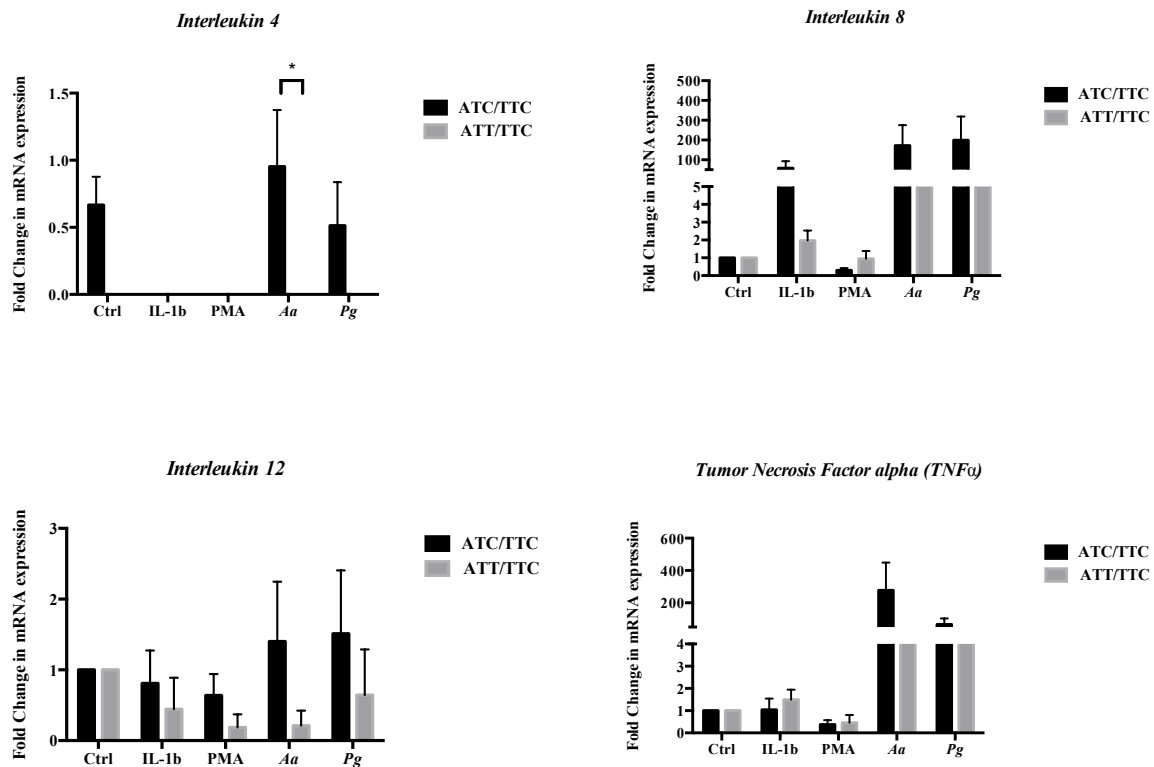
Monocytes

Figure 2: RT-qPCR of monocytes from patients carrying ATC/TTC and ATT/TTC haplotype. Monocytes were isolated from peripheral blood and then stimulated in the presence of immune response inducers (PMA and IL-1 β) and the pathogens commonly found in periodontal disease (*Aa* and *Pg*). Bars indicate mean and standard deviation of the normalized gene expression.

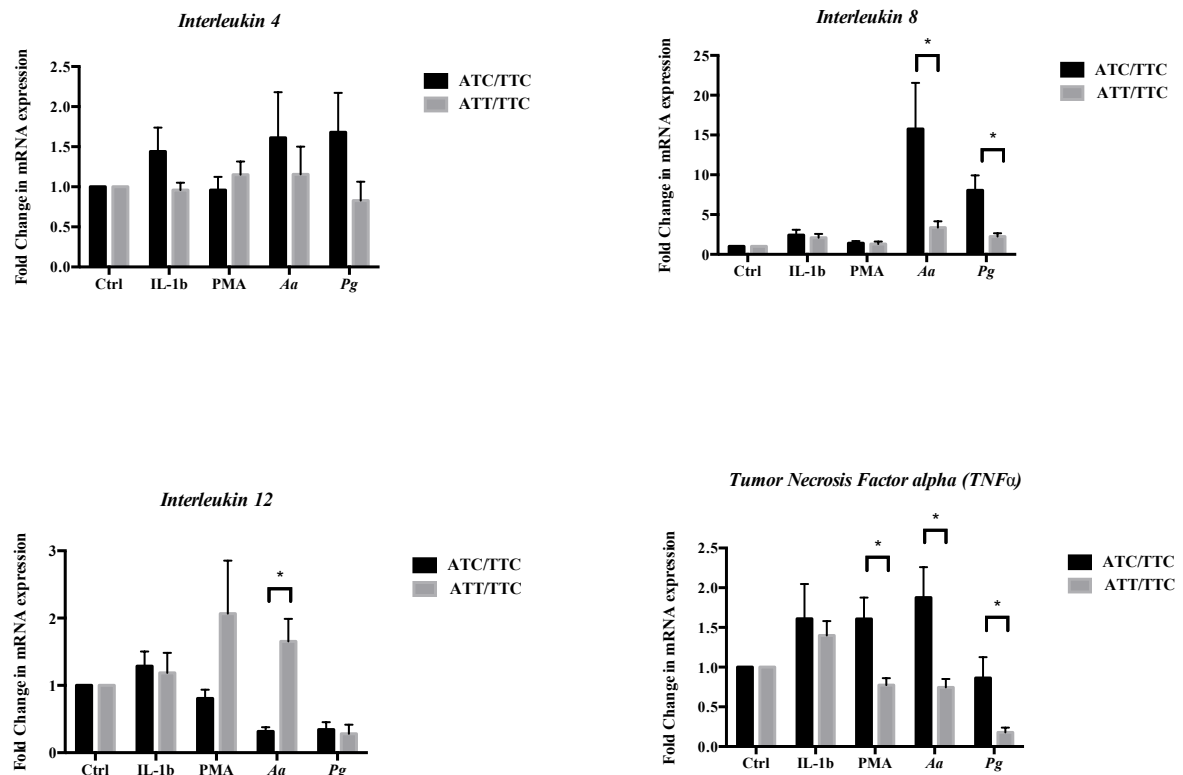
T Cells

Figure 3: RT-qPCR of T lymphocytes from patients carrying ATC/TTC and ATT/TTC haplotype. T lymphocytes were isolated from peripheral blood and then stimulated in the presence of immune response inducers (PMA and IL-1 β) and the pathogens commonly found in periodontal disease (*Aa* and *Pg*). Bars indicate mean and standard deviation of the normalized gene expression.

CAPÍTULO 3

Investigation of the functional role of human Interleukin 8 gene haplotype by CRISPR/Cas9 mediated genome editing

Livia S. Finoti^{1,3,§} & Manjunatha R. Benakanakere^{1,§,*}, Raquel M. Scarel-Caminaga⁴,

Denis F. Kinane^{1,2,*}

1 Department of Periodontics, School of Dental Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

2 Department of Pathology, School of Dental Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

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

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

***Correspondence:** D.F. Kinane and M. Benakanakere, Department of Periodontics, School of Dental Medicine, University of Pennsylvania, 240 South 40th Street, Philadelphia, PA 19104, USA. Email: dfkinane@upenn.edu; bmanju@upenn.edu

§ Equal first authorship

Artigo submetido à Genes and Immunity em 9 de julho de 2015

ABSTRACT

Interleukin 8 (*IL8*) gene polymorphisms have been attributed to the susceptibility to periodontal disease. However, the functional roles of *IL8* gene haplotypes have not been investigated. Here, we demonstrate for the first time the use of CRISPR/Cas9 system to engineer the *IL-8* gene in and tested the functionality of different haplotypes. Two sgRNAs vectors targeting *IL-8* gene and naked homologous repair DNA carrying different haplotypes, we successfully generated HEK293T cell lines carrying AT genotype at first SNP - rs4073 (alias -251), TT genotype at second SNP - rs2227307 (alias +396), TC or CC genotypes at the third SNP - rs2227306 (alias +781) at the *IL8* locus. When *IL8* gene edited cells were stimulated with Poly I:C, ATC/TTC haplotype cells significantly up-regulated the *IL8* at both transcriptional and translational levels. To test whether ATC/TTC haplotype is functional, we used a transwell assay to measure the transmigration of primary neutrophils incubated with supernatants from the Poly I:C stimulation experiment. ATC/TTC haplotype cells significantly increased transmigration of neutrophils confirming the functional role for this *IL8* haplotype. Taken together, our data provides functional evidence that carriage of the ATC/TTC haplotype in itself may increase the influx of neutrophils in inflammatory lesions and influence disease susceptibility.

INTRODUCTION

Interleukin-8 (IL-8) is a pro-inflammatory chemokine produced by cells such as epithelial cells, fibroblasts, endothelial cells, macrophages, lymphocytes and mast cells upon exposure to the inflammatory milieu¹. IL-8 secretion leads to activation and migration of

neutrophils from the peripheral blood to sites of infection that manifest in the clearance of pathogens. Controlled induction of IL-8 is crucial in the maintenance of homeostatic balance. For example, elevated IL-8 induction can lead to exacerbated inflammation in chronic inflammatory diseases^{2,3}. On the contrary, inhibition of IL-8 secretion may delay neutrophil influx creating an advantage for pathogen survival leading to chronic infection.

Elevated *IL8* expression has been attributed to a number of diseases such as chronic obstructive pulmonary disease^{4, 5}, hypertension⁶, carcinogenesis^{7, 8}, idiopathic pulmonary fibrosis⁹⁻¹¹ and chronic periodontitis¹². Previous studies have investigated the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) with the level of *IL8* gene expression. The SNP rs4073 (alias -251) in the *IL8* gene has been considered functional, since the -251A allele was related to higher levels of IL-8 production in vitro, after stimulation with lipopolysaccharide and cytokines¹³. This agrees with the finding that the AA genotype of -251 SNP in the *IL8* gene was associated with greater IL-8 mRNA expression¹⁴. However, another study demonstrated that the TA genotype in this -251 SNP was associated with increased IL-8 mRNA levels¹⁵.

The genetic polymorphisms are prevalent in any given population and are often reported to differ between health and disease^{16, 17}. The association between SNPs and periodontitis is well-documented¹⁷⁻¹⁹. In particular, -251(T/A), +396(T/G) and +781(C/T) polymorphisms in the *IL8* gene, forming the haplotype ATC/TTC is associated with periodontal disease and carriers of this haplotype had 2 times higher disease susceptibility than the other haplotypes, such as the ATT/TTC, which was not associated with susceptibility to periodontal disease²⁰. Numerous reports investigated

whether polymorphisms in this gene influence the levels of periodontopathogens and the production of IL-8 by comparing outcomes among patients carrying different haplotypes²¹⁻²³. Despite the importance of IL-8 in disease susceptibility, the biological explanation of the specific role of *IL8* haplotype in the regulation of gene expression, and whether the ability and the activity of neutrophils modulated by the carriage of the *IL8* haplotype have not been addressed previously. Hence, to determine the role of different *IL8* haplotypes in transcriptional and translational activity of *IL8* gene and to test whether or not it affects neutrophil migration, we used clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) RNA-guided Cas9 nucleases to edit *IL8* gene with ease, speed and accuracy that permitted us to study functional aspects of *IL8* haplotypes. CRISPR/Cas9 system has been recently used in engineering the genomes²⁴⁻²⁶. This study represents a novel means to perform genome editing by using a naked double stranded DNA as a homologous repair template to discover the functional role of genes and in this report we focus on the functional effects related to the *IL8* haplotypes.

MATERIAL AND METHODS

CRISPR-Cas9 vector construction:

The bicistronic pX330 vector was procured from Addgene (plasmid n°. 42230). This vector constructed with cDNAs encoding human codon-optimized *Streptococcus pyogenes* Cas9 (hSpCas9) that binds to and cleaves DNA, and an adaptable CRISPR RNA (crRNA)/trans-activating crRNA chimera containing adjacent *BbsI* cloning sites for protospacer “guide sequence” (sgRNA) insertion (**Figure 1**). The plasmid was

transformed into DH5 α competent cells (Life Technologies, US) and were selected on 100 μ g/mL Ampicillin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) LB plates. A single +ve bacterial colony was inoculated in 1mL of LB medium and allowed to grow on a shaker at 37°C. After overnight culture, plasmid was isolated by using a PureLink Quick Plasmid Miniprep kit (InvitrogenTM, Carlsbad, CA).

sgRNA Target Design:

In order to improve the specificity of off-targets, Target Finder program from Feng Zhang lab's was used to design specific sgRNA ²⁷. DNA cleavage requires synergistic interaction of two independent specificity-encoding DNA-binding modules. This allowed us to define parameters for the selection of sgRNA pairs that facilitate effective double nicking in which gRNA1 had to be downstream to the first SNP (-251) as well as gRNA2 upstream to the third SNP (+781) of the *IL8* gene. Therefore 28-bp and 27-bp guide sequences targeting DNA were selected based on predicted high specificity protospacer adjacent to motif (PAM) target sites on the *IL8* gene. Two complementary oligos containing guide sequence including *BbsI* ligation adapters were synthesized by Idt DNA technologies for each sequence.

sgRNA expression vector construction:

The sense and antisense single stranded DNA of each oligos pair (100 mM) were annealed using 0.5 μ L of T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, MA) and 1 μ L 10X T4 Ligation Buffer in a total volume of 10 μ L by incubating the oligo mix at 37°C for 30 min, then 95°C for 5 min, followed by a ramp to 25°C at 5°C/min ²⁸. The annealed

oligos (gRNA1 and gRNA2) were ligated into the *BbsI*-digested pX330 vector using 2µL 10x Fast Digest Buffer (Life Technologies, Paisley, UK), and 0.5µL of T7 DNA ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA) ²⁹. The ligation mixture was treated with Plasmid Safe exonuclease and transformed in OneShot chemically competent DH5α cells (Life Technologies, Paisley, UK). Transformed clones were selected on 100µg/mL Ampicillin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) LB plates. After plasmid DNA extraction (Qiagen, Silicon Valley, CA), the sequence of the construct was verified by automated DNA sequence analysis performed at the University of Pennsylvania's DNA sequencing core facility.

Homologous repair template:

Generation of a targeted double-strand DNA break (DSB) creates multiple repair choices ³⁰. A DSB may be repaired via homology-directed repair (HDR) by using homologous DNA as a template. For our experimental purpose, homologous repair templates were constructed in two steps. First, we sequenced DNA of de-identified human subjects from previous study ²⁰ in order to confirm and select DNA sample that represented ATT/TTC haplotype, and one sample that represented ATC/TTC haplotype. Second, we PCR-amplified the fragment corresponding to the same region which was excised by complex CRISPR/Cas9 with guide sequence insert 1 and guide sequence insert 2 (Table 1). The products of the reactions were verified on 1% agarose gel. The fragments of interest were excised from the gel for purification using PureLink purification kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions and verified by DNA sequencing.

Cell Culture and Transfection:

HEK293T cells were cultured in six-well plates to 50 – 60% confluence with pre-warmed starving medium (DMEM supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin) and incubated in a 5% CO₂ incubator at 37 °C. Transfections were performed in four different conditions: 1. Transfection with two specific CRISPR/Cas9 plasmid constructs in addition to homologous repair template with ATT/TTC haplotype; 2. Transfection with two specific CRISPR/Cas9 constructs in addition to homologous repair template containing ATC/TTC haplotype; 3. Transfection with two specific CRISPR/Cas9 constructs; 4. Negative control (Cells transfected with TE (1X) and transfection reagent. A total of 2.5×10^5 cells were transfected with 0.5 µg of each sgRNA plasmid and 0.2 µg of DNA template using the GenMute Reagent (SignaGen Laboratories, MD) according to the manufacturer's instructions. The medium was replaced with fresh medium the following day and at 48 h post-transfection. Seventy-two hours post-transfection, the cells were harvested and low density of cells transferred to 96 well plates for clonal selection. The genomic DNA was extracted using QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Silicon Valley, CA). A PCR reaction was performed using guide sequence insert 1 forward and guide sequence insert 2 reverse primers (**Table 1**). The homologous repair template inserts with the SNPs were confirmed by DNA sequence analysis performed at the University of Pennsylvania's DNA sequencing core facility. Out of 10 clones each, 4 clones from ATT/TTC haplotype and 1 clone from ATC/TTC haplotype were found to be positive.

Stimulation of HEK293T cells:

TLR3 pathway induces the IL-8 expression when stimulated by poly I:C, a TLR3 agonist³¹. To perform the functional analysis, HEK293T cells that were genome edited to carry haplotypes and along with control cells were cultured in six-well dishes to 70-80% confluence with pre-warmed starving medium (DMEM supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin,) and incubated in fresh starving medium in a 5% CO₂ incubator at 37°C. A total of 0.5×10^6 cells were stimulated with Poly I:C of 5 µg/mL for the 24 h. There were six conditions: 1) HEK293T cells with ATT/TTC haplotype stimulated with TLR3 agonist poly I:C; 2) HEK293T cells with ATC/TTC haplotype stimulated with TLR3 agonist poly I:C; 3) HEK293T cells stimulated with TLR3 agonist poly I:C; 4) HEK293T cells with ATT/TTC haplotype non-stimulated; 5) HEK293T cells with ATC/TTC haplotype non-stimulated; 6) HEK293T cells non- stimulated. Subsequently, experiments were carried out for the assessment of *IL8* gene expression, quantitation of IL-8 protein and Neutrophil migration.

Neutrophil isolation:

Human PMN were isolated from healthy volunteers with the approval of University of Pennsylvania's Institutional Review Board. Five milliliter of whole blood was obtained by venipuncture into tubes containing sodium heparin (Becton Dickinson, San Jose, CA). Neutrophils were isolated according to Nauseef, 2014³². Neutrophils were washed several times, and resuspended in pre-warmed DMEM medium.

PMN transmigration assay:

We have adapted a neutrophil transmigration assay protocol as previously described ³³. The assay was conducted in a modified 24-well (3.0 μ M pore size) chamber (Corning Incorporated, NLD). Eight hundred microliters of the supernatant described in step above was placed in each well. The recombinant human IL-8 (R&D Systems, Minneapolis, MN) was used as a positive control as well as only DMEM medium was used as negative control. Subsequently PMNs (1×10^6) were added to the top (basolateral) chamber and incubated at 37 °C for 2 h. PMNs that migrated across the bottom (apical) chamber were quantified by fluorescence activated cell sorting (FACS) using BD AccuriTM C6 flow cytometer.

Quantitative real-time RT-PCR:

Total RNA of each condition was isolated using the RNeasy kit (Qiagen, Silicon Valley, CA) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity and quantity were checked by spectrometry with a NanoDrop ND1000 spectrophotometer. Five micrograms total RNA was used for cDNA synthesis with the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Real-time PCR was performed using the cDNA (50 ng) with *IL8* as primer and probe and *GAPDH* as endogenous control on ABI 7500 Fast system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) in the presence of TaqMan DNA polymerase according to Benakankakere et al., 2015 ³⁴. The data were analyzed by DDCT method ³⁵ normalizing mRNA level to mRNA AGT/TTC with poly I:C stimulus.

ELISA:

Two hundred microliters of culture supernatant described in step “Stimulation of HEK293T cells with Poly I:C” was used. IL-8 level was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercially available kit (BD Biosciences, CA) according to the manufacturer’s instruction. The absorbance was read at 450 nm. The concentrations were expressed in pg/ml.

Statistical Analysis:

Data displayed for each figure is from at least three independent experiments with a mean (standard deviation) of at least three independent data points/condition. Each experiment has been repeated multiple times yielding similar results. Statistical analysis was done using GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA). Data were analyzed with one- way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests. Statistical differences were considered significant at the $p < 0.05$ level and indicated by an asterisk ($p < 0.05$ (*)).

RESULTS***Cloning and validation of CRISPR/Cas9 for IL-8 genome-editing:***

In order to test if the RNA-guided CRISPR/Cas9 system could be applied for gene double nicking, the single stranded sequences of the sgRNA1 and sgRNA2 were cloned into pX330 vector as described in methods section. The constructs were verified by DNA sequencing using U6 promoter DNA sequencing primer (5'-CAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGA-3'). The DNA sequencing and multiple

alignment of the region with sense and antisense single stranded oligos showed upstream *U6* promoter sequence and the inserted targeting sequence of sgRNA1 as well as sgRNA2 on pX330 vector (**Figure 2A and Figure 2B**).

Generation of HEK293T cell lines carrying *IL8* haplotypes:

HEK293T cells were transfected with the pX330-sgRNA1 and 2 plasmids in addition to homologous repair templates with different *IL8* haplotypes separately. Positive clones were selected as described in the methods section. Results showed the generation of three conditions of edited and non-edited cell lines (**Figure 3**): 1) AT genotype in the first SNP - rs4073 (alias -251), TT genotype in the second SNP - rs2227307 (alias +396), TC genotype at the third SNP - rs2227306 (alias +781); 2) AT genotype at the first SNP, TT genotype at the second SNP, CC genotype at the third SNP; 3) AA genotype at 1231 nucleotide position, GG genotype in 1877 nucleotide position, TT genotype in 2262 nucleotide position. CRISPR/cas9 method allowed us to create cell lines carrying *IL8* haplotypes.

ATC/TTC haplotype up-regulate *IL-8* gene at transcriptional level:

To identify the regulation of cytokines in gene edited and wild type cells, we stimulated with stimulation with a TLR3 agonist poly I:C to determine whether or not carrying the haplotype affects the transcriptional levels. After 24 h of stimulation, IL-8 messenger RNA (mRNA) levels were measured by quantitative real-time PCR. The analysis revealed that Poly I:C stimulus enhanced IL-8 mRNA expression compared to unstimulated negative control as expected (**Figure 4**). Interestingly, IL-8 mRNA levels

induced by cells carrying ATC/TTC haplotype was significantly higher when compared with IL-8 mRNA levels induced by ATT/TTC haplotype under poly I:C stimulus (**Figure 4**).

ATC/TTC haplotypes up-regulate IL-8 secretion at protein level:

The increase in mRNA levels in the cells prompted us to test the IL-8 protein levels in the supernatants. Gene edited and wild type cells were stimulated with Poly I:C for 24 h as described above. Secreted IL-8 was measured in the supernatant by ELISA. As expected poly I:C stimulated samples had higher levels of IL-8 compared with un-stimulated samples (**Figure 5**). Similar to mRNA levels, IL-8 protein levels induced by ATC/TTC haplotype was significantly higher when compared with the IL-8 protein levels induced by ATT/TTC haplotype upon poly I:C stimulation (**Figure 5**).

ATC/TTC IL-8 haplotype increase PMN transmigration:

To test the functionality of different haplotypes on *IL8* gene, we screened edited and wild type cells to determine whether any of the haplotypes are altered in their ability to promote PMN transmigration. As expected, the capacity to induce PMN transmigration in un-stimulated cells' supernatant was lower than poly I:C stimulated cells. The response to negative control (DMEM media) was minimal contrary to the recombinant human IL-8, which is used as positive control, was the highest when compared to other conditions. It was also observed that the cells carrying ATC/TTC haplotype dramatically increased its capacity to induce PMN transmigration when compared with ATT/TTC haplotype with poly I:C stimulation (**Figure 6**). This increase in migration could be concentration

dependent as ATC/TTC cell type induced higher IL-8 induction.

DISCUSSION

Interleukin-8 (IL-8) is considered an important chemokine in periodontal disease. This cytokine is produced by a variety of cells and may function in concert with other members of the cytokine family to regulate the host's innate responses^{2, 36-38}. Specifically, this cytokine attracts leukocytes from the periphery to the sites of infection and activates them to become phagocytes. Intra-cutaneous administration of IL-8 in vivo induced local exudation and long lasting accumulation of neutrophils³⁹. This suggests that IL-8 is indispensable for neutrophil migration and function. Neutrophil function is not only important in acute infections but also play a major role in chronic inflammatory disorders such as periodontitis, atherosclerosis, psoriasis, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, diabetes and cancer^{40,41}.

Recent meta-analyses showed a positive association of -251(T/A) polymorphism on *IL8* gene to chronic periodontitis^{42, 43}. Few case-control studies have investigated different haplotypes in the *IL8* gene that were found to be associated with periodontitis^{20, 44, 45}, such as the ATC/TTC haplotype whose carriers of this particular haplotype had two times higher disease susceptibility²⁰. In spite of this, the IL-8 protein levels in the GCF of patients were not correlated to the carriage of ATC/TTC haplotype²². This negative correlation could be attributed to the limited sample size in that study, besides the individuals with chronic periodontitis enrolled in that study were not affected by severe and generalized disease.

Face to the lack of functional assays, we hypothesized that an in vitro study with more

controlled conditions could be able to detect the potential influence of different haplotypes in the IL-8 mRNA and protein levels. This present study demonstrated that the presence of ATC/TTC haplotype can up-regulate the IL-8 in both mRNA and protein levels. These higher IL-8 mRNA and protein levels coupled with neutrophil migration could explain the lower periodontopathogens levels found in patients carrying the ATC/TTC haplotype^{21,46}. Also, high levels of IL-8 may increase the immune response and subsequent damage to the integrity of periodontium. We think that the present findings could explain why the periodontal destruction may occur in patients who were considered to be genetically susceptible to chronic periodontitis with a lower microbial challenge because of the presence of the *IL8* ATC/TTC haplotype than in patients without it^{21,46}.

The same ATC/TTC haplotype was also shown to be associated with bronchial asthma, while the rs4073T>A SNP when tested alone did not show significant association⁴⁷. Other studies reported similar lack of association with chronic periodontitis when a SNP was analyzed individually, but when the haplotype was considered in the analysis, the association with the disease was revealed^{45,48}. Therefore, these studies corroborate the idea that haplotypes are more powerful for detection of disease association than individual polymorphisms and they may give more information about the basis of disease^{45,49}. Despite the previously reported functional role of rs4073T>A SNP¹³, a study by Hacking et al. (2004) failed to confirm this association⁵⁰. Hacking et al., and others suggested that the existence of another SNP (closer to rs4073T>A) could play a role in modulating IL-8 gene expression^{20, 50-52}. Hence, we noticed in our study that the +781(C/T) SNP rs2227306 in the *IL8* gene seems to influence the IL-8 in both mRNA

and protein levels, considering that the difference in the haplotypes analyzed here was regarding the alleles in that position.

A study by Ahn et al., in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) showed increase in IL-8 levels in patients carrying the A allele in the rs4073T>A SNP ⁵³. The authors used a luciferase assay to measure the activity and determined the level of IL-8 in the presence or absence of promoter SNP. They found increased luciferase activity in the presence of rs4073T>A SNP in the promoter of *IL8* gene. The authors concluded that *IL8* promoter SNP may increase susceptibility to the development of IPF via the up-regulation of IL-8 ⁵³. By using similar reporter vector system, Meade et al., investigated bovine *IL8* promoter haplotypes in vitro ⁵⁴. The authors found that the luciferase promoter carrying one of the haplotype IL-8-h2 (C – GTAC) highly up-regulated luciferase activity upon LPS and TNF stimulation confirming SNP functionality and suggesting a differential transcriptional factor binding to IL-8-h2 promoter (such as C/EBP, Oct-1, NFkB and NFAT)⁵⁴. Hacking et al. (2004) observed that C/EBPb (CCAAT/enhancer binding protein-beta) bound to the transcriptional complex in the presence of rs4073T>A allele in respiratory epithelial cells but not in primary lymphocyte cells suggesting cell type specificity in transcriptional regulation ⁵⁰. Although, the luciferase reporter assays is an accepted technique that can be used to test the functionality of SNP, we believe that it is an artificial system that does not contain complex regulatory elements found on the chromatin. To overcome this gap in the functional analysis of haplotypes and test our hypothesis, we adopted a novel technique called clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) RNA-guided Cas9 nuclease system ³⁰ to edit the IL-8 gene in human embryonic kidney cell line

(HEK293T). This technology is currently a burning topic in the field of genome editing and an invaluable tool to engineer genomes of choice ⁵⁵. For generating *IL8* editing cell lines, we choose HEK293T cells as the model system as this cell line is commonly used with CRISPR/Cas9 technology, making them a well established model system to test the efficacy of RNA-guided endonucleases in gene editing ^{56, 57}. With this technique, we were able to successfully edit the *IL8* gene within the HEK293T genome to carry different haplotypes with unprecedented precision and ease. Further, we were able to test the effect of different haplotypes in the *IL8* gene transcription, protein and also functionally evaluate their ability in modulating neutrophil transmigration. The methodology used for this purpose offers a simple and applicable framework for generating validated edited cell lines. Our workflow is adapted from previously published methods and/or in house developed protocols especially utilizing naked double stranded DNA for genome editing that can be divided into four phases: 1) sgRNA target design ²⁷; 2) sgRNA expression vector construction ²⁹; 3) Homologous repair templates to homology-directed repair (HDR); 4) Cell culture and transfections. This methodology using the CRISPR/Cas9 system demonstrated that the presence of ATC/TTC haplotype can up-regulate the IL-8 in HEK293T cells upon Poly I:C stimulation. Roy et al. generated two clonal cell lines targeting exon 1 of the *WNK1* gene by using a similar technique within short period of time ⁵⁶. Since CRISPR/Cas9 system is still new and being validated, we found fewer publications related to SNP and haplotype editing in general.

In summary, our data demonstrate that the ATC/TTC in the *IL8* gene can have a positive outcome on the transcriptional and translational levels of *IL8* gene and thus may

modulate neutrophil recruitment at the site of infection. Taken together, because of the critical role neutrophils have in periodontal disease, it is plausible that the carriage of a particular *IL8* haplotype ATC/TTC may contribute to periodontal disease susceptibility.

ACKNOWLEDGMENT:

This research was supported by DE023836 from the National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH to DFK. LSF would like to acknowledge the financial supports from Capes/PDSE under Process BEX 2563/14-2, Government of Brazil.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. 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**(4): 1045-9.
2. Kinane DF, Galicia JC, Gorr SU, Stathopoulou PG, Benakanakere M. P. gingivalis interactions with epithelial cells. *Front Biosci* 2008; **13**: 966-84.
3. Ferreira SB, Jr., Trombone AP, Repeke CE, Cardoso CR, Martins W, Jr., Santos CF *et al.* An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. *Infect Immun* 2008; **76**(8): 3725-34.

4. Gilowska I. [CXCL8 (interleukin 8)--the key inflammatory mediator in chronic obstructive pulmonary disease?]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2014; **68**: 842-50.
5. 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.
6. Martynowicz H, Janus A, Nowacki D, Mazur G. The role of chemokines in hypertension. *Adv Clin Exp Med* 2014; **23**(3): 319-25.
7. Gales D, Clark C, Manne U, Samuel T. The Chemokine CXCL8 in Carcinogenesis and Drug Response. *ISRN Oncol* 2013; **2013**: 859154.
8. Felipe AV, Silva TD, Pimenta CA, Kassab P, Forones NM. Interleukin-8 gene polymorphism and susceptibility to gastric cancer in a Brazilian population. *Biol Res* 2012; **45**(4): 369-74.
9. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; **284**(4): L566-77.
10. Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 2000; **72**(4): 391-8.
11. Lin CH, Wang YH, Chen YW, Lin YL, Chen BC, Chen MC. Transcriptional and posttranscriptional regulation of CXCL8/IL-8 gene expression induced by connective tissue growth factor. *Immunol Res* 2015.
12. Konopka L, Pietrzak A, Brzezinska-Blaszczyk E. Effect of scaling and root planing on interleukin-1beta, interleukin-8 and MMP-8 levels in gingival

- crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *Journal of periodontal research* 2012; **47**(6): 681-8.
13. 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.
 14. Wacharasint P, Nakada TA, Boyd JH, Russell JA, Walley KR. AA genotype of IL-8 -251A/T is associated with low PaO(2)/FiO(2) in critically ill patients and with increased IL-8 expression. *Respirology* 2012; **17**(8): 1253-60.
 15. 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**(6): 893-9.
 16. Shapira L, Wilensky A, Kinane DF. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol* 2005; **32 Suppl 6**: 72-86.
 17. Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; **14**(6): 430-49.
 18. Kinane DF, Shiba H, Stathopoulou PG, Zhao H, Lappin DF, Singh A *et al.* Gingival epithelial cells heterozygous for Toll-like receptor 4 polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile are hypo-responsive to *Porphyromonas gingivalis*. *Genes Immun* 2006; **7**(3): 190-200.
 19. Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000* 2005; **39**: 91-117.

20. 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.
21. Finoti LS, Corbi SC, Anovazzi G, Teixeira SR, Capela MV, Tanaka MH *et al.* Pathogen levels and clinical response to periodontal treatment in patients with Interleukin 8 haplotypes. *Pathog Dis* 2013.
22. 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**(10): 1355-61.
23. 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**(4): 489-98.
24. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014; **157**(6): 1262-78.
25. Sternberg SH, Doudna JA. Expanding the Biologist's Toolkit with CRISPR-Cas9. *Mol Cell* 2015; **58**(4): 568-574.
26. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; **346**(6213): 1258096.
27. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology* 2013; **31**(9): 827-32.

28. Benakanakere MR, Li Q, Eskan MA, Singh AV, Zhao J, Galicia JC *et al.* Modulation of TLR2 protein expression by miR-105 in human oral keratinocytes. *J Biol Chem* 2009; **284**(34): 23107-15.
29. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* 2013; **8**(11): 2281-308.
30. Hartenian E, Doench JG. Genetic screens and functional genomics using CRISPR/Cas9 technology. *The FEBS journal* 2015; **282**(8): 1383-93.
31. Antoniak S, Mackman N. Multiple roles of the coagulation protease cascade during virus infection. *Blood* 2014; **123**(17): 2605-13.
32. Nauseef WM. Isolation of human neutrophils from venous blood. *Methods Mol Biol* 2014; **1124**: 13-8.
33. Kusek ME, Pazos MA, Pirzai W, Hurley BP. In vitro coculture assay to assess pathogen induced neutrophil trans-epithelial migration. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2014; (83): e50823.
34. Benakanakere M, Abdolhosseini M, Hosur K, Finoti LS, Kinane DF. TLR2 promoter hypermethylation creates innate immune dysbiosis. *J Dent Res* 2015; **94**(1): 183-91.
35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**(4): 402-8.

36. Benakanakere M, Kinane DF. Innate cellular responses to the periodontal biofilm. *Front Oral Biol* 2012; **15**: 41-55.
37. Chung RM, Grbic JT, Lamster IB. Interleukin-8 and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 1997; **24**(3): 146-52.
38. Kinane DF, Zhang P, Benakanakere M, Singleton J, Biesbrock A, Nonnenmacher C *et al.* Experimental gingivitis, bacteremia and systemic biomarkers: a randomized clinical trial. *Journal of periodontal research* 2015.
39. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol* 1993; **64**(5 Suppl): 456-60.
40. Hajishengallis G, Chavakis T, Hajishengallis E, Lambris JD. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis. *J Leukoc Biol* 2014.
41. Hajishengallis G, Sahingur SE. Novel inflammatory pathways in periodontitis. *Adv Dent Res* 2014; **26**(1): 23-9.
42. Chen X, Huang J, Zhong L, Ding C. Quantitative assessment of the associations between interleukin-8 polymorphisms and periodontitis susceptibility. *J Periodontol* 2015; **86**(2): 292-300.
43. Hu YY, Liu JH, Jiang GB, Yuan RX, Niu YM, Shen M. Association between Interleukin-1beta Gene -511C>T/+3954C>T Polymorphisms and Aggressive Periodontitis Susceptibility: Evidence from a Meta-Analysis. *Med Sci Monit* 2015; **21**: 1617-24.

44. Borilova Linhartova P, Vokurka J, Poskerova H, Fassmann A, Izakovicova Holla L. Haplotype analysis of interleukin-8 gene polymorphisms in chronic and aggressive periodontitis. *Mediators of inflammation* 2013; **2013**: 342351.
45. Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, Mendes-Junior CT *et al.* Association of haplotypes in the IL8 gene with susceptibility to chronic periodontitis in a Brazilian population. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2010; **411**(17-18): 1264-8.
46. 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**(10): 1333-40.
47. Puthothu B, Krueger M, Heinze J, Forster J, Heinzmann A. Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections. *Clinical and molecular allergy : CMA* 2006; **4**: 2.
48. Linhartova P, Cernochova P, Izakovicova Holla L. IL1 gene polymorphisms in relation to external apical root resorption concurrent with orthodontia. *Oral diseases* 2013; **19**(3): 262-70.
49. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annual review of medicine* 2005; **56**: 303-20.

50. 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 Immun* 2004; **5**(4): 274-82.
51. Arinami T, Ohtsuki T, Ishiguro H, Ujike H, Tanaka Y, Morita Y *et al.* Genomewide high-density SNP linkage analysis of 236 Japanese families supports the existence of schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 1p, 14q, and 20p. *American journal of human genetics* 2005; **77**(6): 937-44.
52. Savage SA, Abnet CC, Mark SD, Qiao YL, Dong ZW, Dawsey SM *et al.* Variants of the IL8 and IL8RB genes and risk for gastric cardia adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2004; **13**(12): 2251-7.
53. 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.
54. Meade KG, O'Gorman GM, Narciandi F, Machugh DE, O'Farrelly C. Functional characterisation of bovine interleukin 8 promoter haplotypes in vitro. *Mol Immunol* 2012; **50**(1-2): 108-16.

-
55. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G *et al.* Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science* 2015; **348**(6230): 36-8.
 56. Roy A, Goodman JH, Begum G, Donnelly BF, Pittman G, Weinman EJ *et al.* Generation of WNK1 knockout cell lines by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *American journal of physiology. Renal physiology* 2015; **308**(4): F366-76.
 57. Nihongaki Y, Kawano F, Nakajima T, Sato M. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nature biotechnology* 2015.

FIGURES

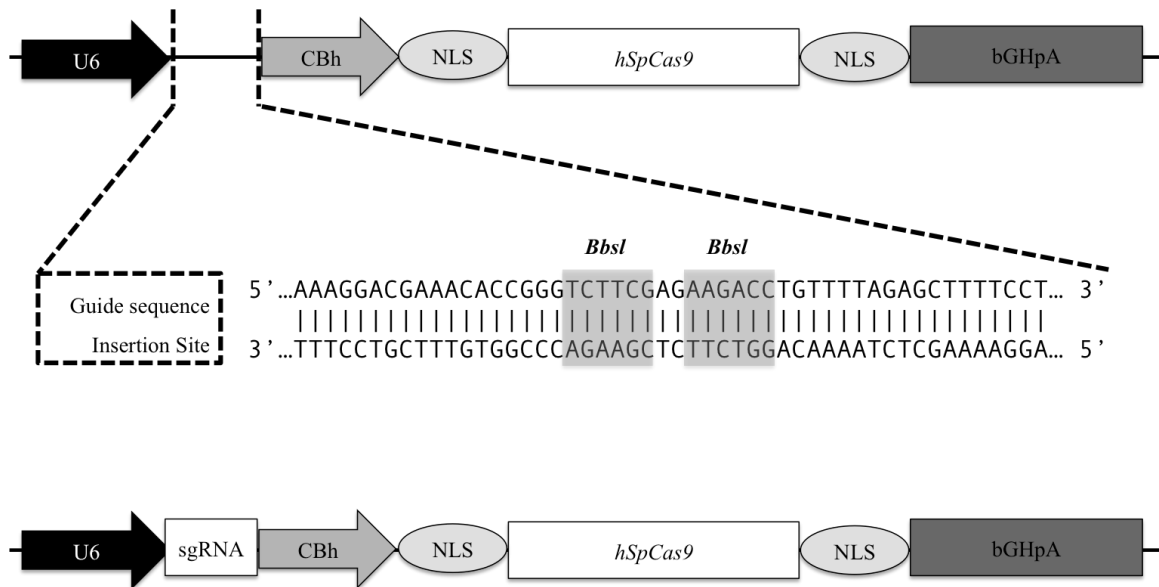


Figure 1. Schematic diagram of pX330-based vector with *U6* promoter driving sgRNA and expression of Cas9 (*hSpCas9*). The expanded view illustrates the nucleotide sequence of *IL8* spanning a portion of the guide sequence insertion site with *BbsI* sites indicated for protospacer “guide sequence” (sgRNA) insertion.

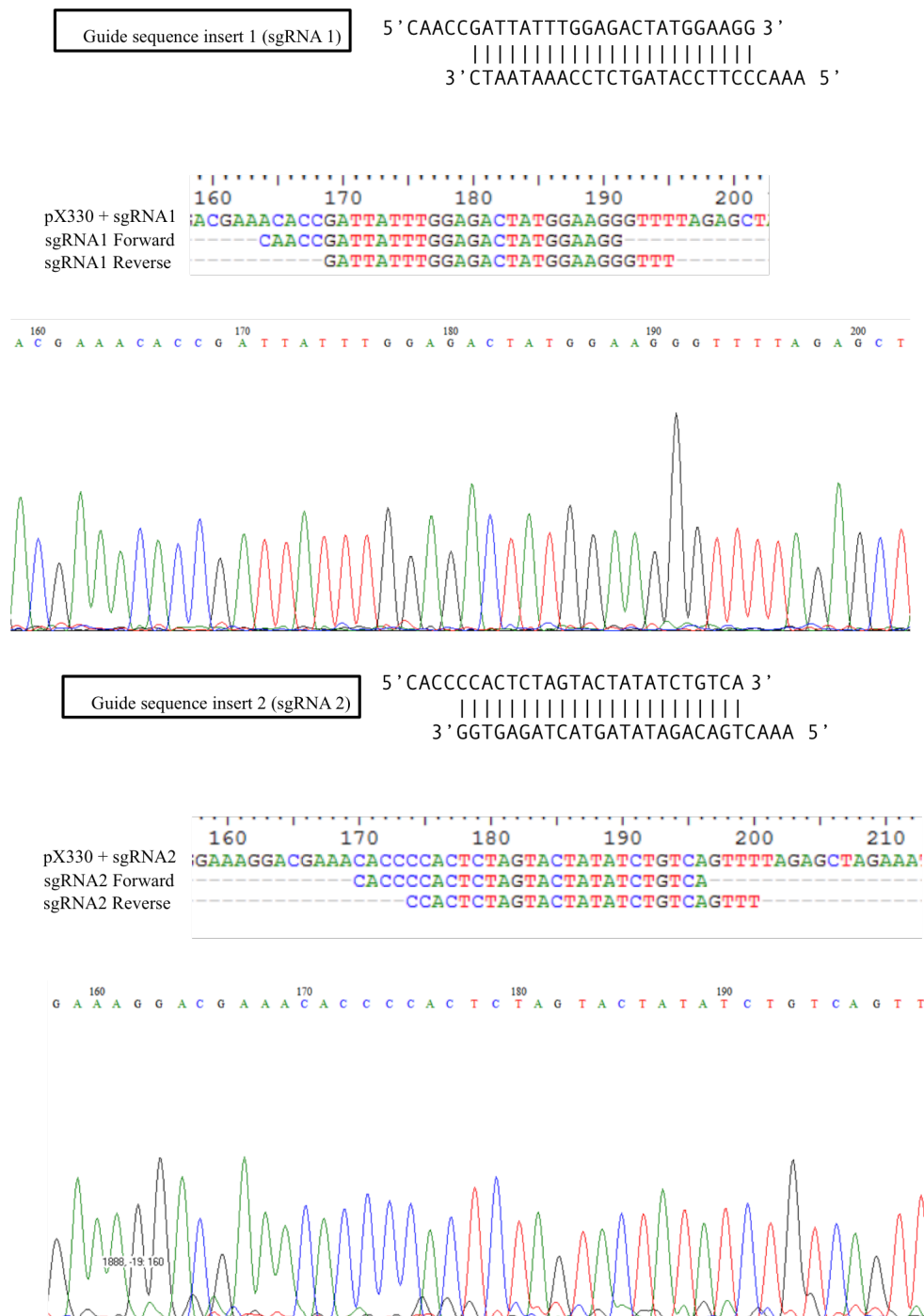


Figure 2. Sequence validations of insert targeting sequence of sgRNA1 (A) and sgRNA2 (B) with upstream *U6* promoter sequence on pX330 vector. The inserts were confirmed by sequencing both forward and reverse strands.

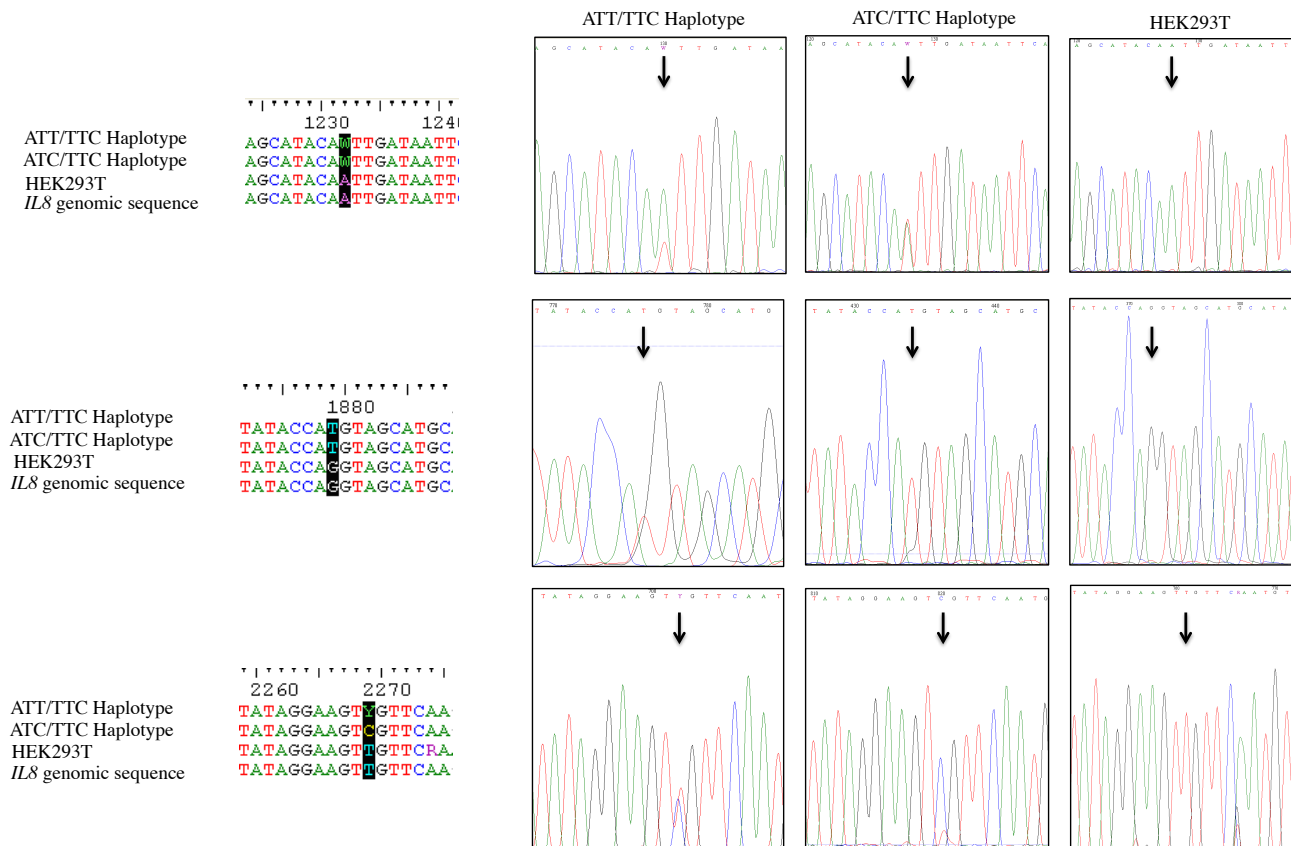


Figure 3. Generation and sequence validation of three cell lines. A. HEK293T cells with ATT/TTC *IL8* Haplotype; B. HEK293T cells with ATC/TTC *IL8* Haplotype; C. HEK293T cells without *IL8* Haplotype (wild type). Genomic PCR (gPCR) products were amplified from HEK293T cells transfected with pX330-sgRNA plasmids in addition to homologous repair templates that present different *IL8* haplotypes (Arrows and dark background on the chromatogram and sequences showing corresponding nucleotides, respectively).

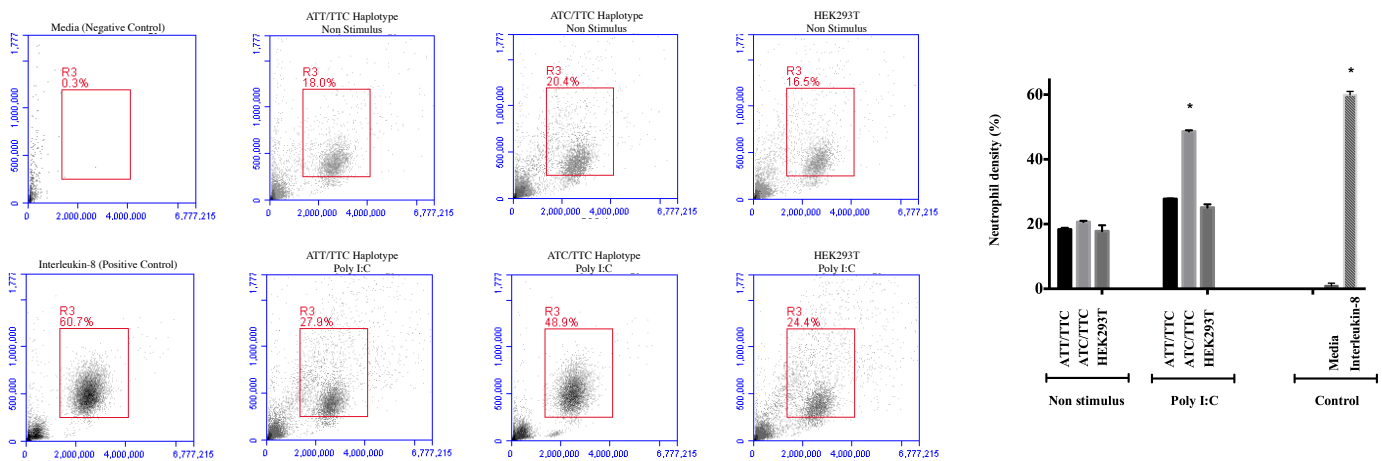


Figure 4. Transwell assay for neutrophil transmigration. Genome edited and wild type cells were stimulated with Poly I:C and supernatant was used in transwell system to monitor whether or not cells are altered in their ability to promote PMN transmigration. After the migration assay, the average number of migrated PMN cells are analyzed by FACS (A) and plotted in a bar diagram where the results are expressed as the means $\pm$ SD obtained from 6 fields/group herewith negative and positive control (B). Supernatant from ATC/TTC haplotype recruited significantly higher neutrophils compared to that of wild type. Statistical comparisons are from three independent experiments (*p-value < 0.05).

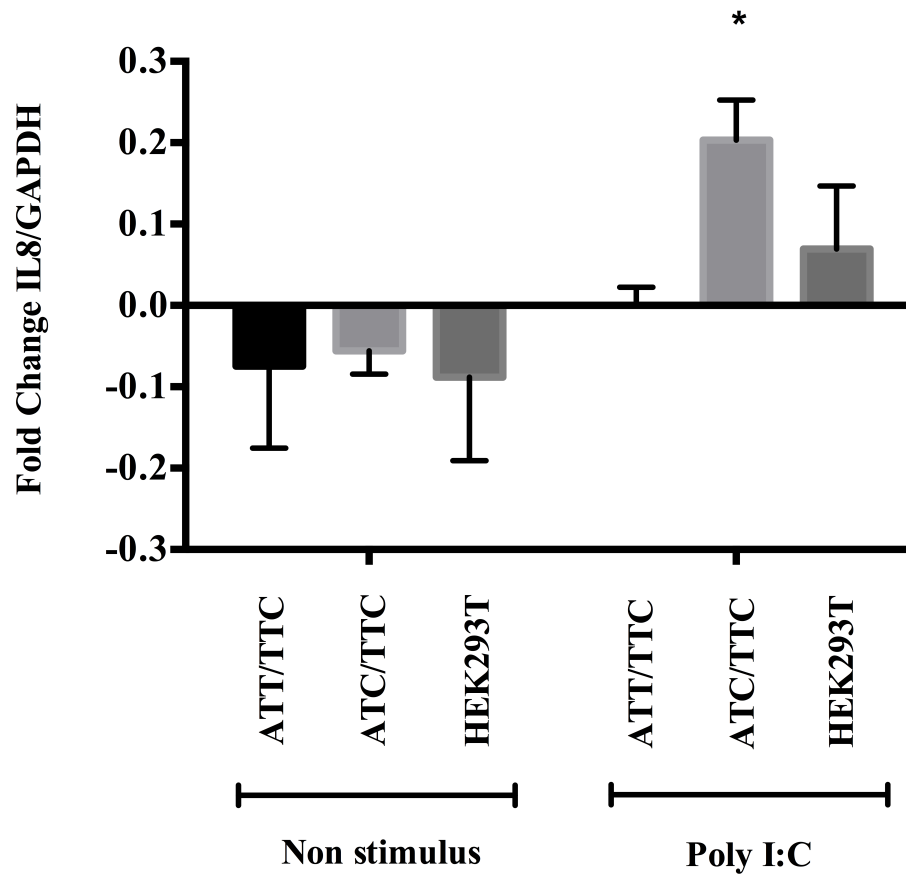


Figure 5. IL-8 mRNA levels in CRISPR/Cas9 edited HEK293T cells. Quantitative real-time PCR showing IL-8 mRNA expression in edited and wild type HEK293T cells challenged with Poly I:C for 24 h. The un-stimulated cells served as negative control. ATC/TTC haplotype significantly up-regulated IL-8 mRNA levels upon Poly I:C treatment. Values represent mean $\pm$ SD of at least three independent experiments (*p-value < 0.05).

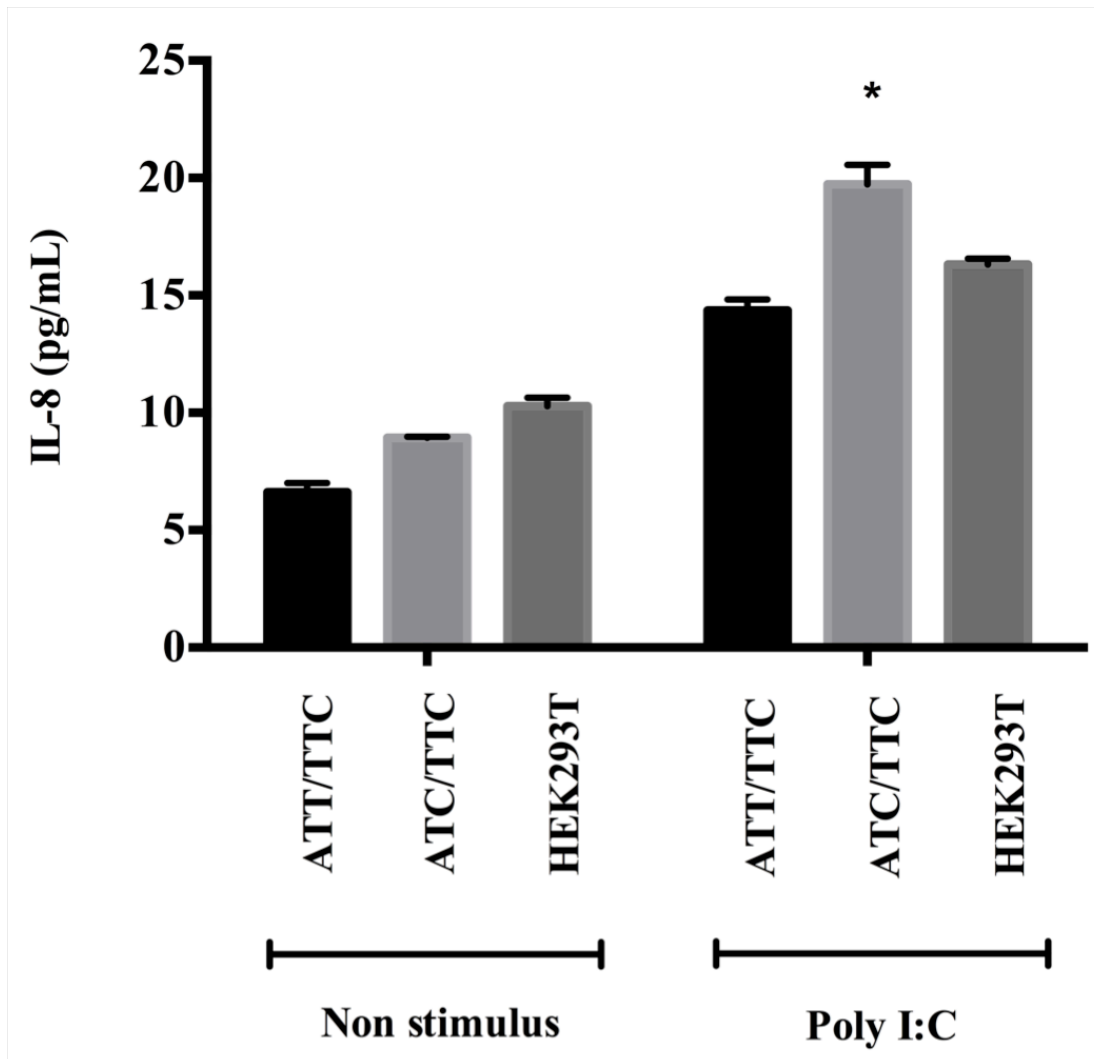


Figure 6. IL-8 protein expression in CRISPR/Cas9 edited HEK293T cells. ELISA was performed from edited and wild type cells stimulated with Poly I:C for 24 h. Unstimulated cells served as negative control. ATC/TTC haplotype significantly up-regulated IL-8 protein levels upon Poly I:C treatment. Values represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments (*p-value < 0.05).

Table 1. Targeting sites chosen for Cas9-HR and oligonucleotides used to generate the corresponding gRNAs

Applications	Target sequence (PAM IS underlined)
Guide sequence insert 1 Forward	5'CAACCGATTATTTGGGAGACTATGGA <u>AGG</u> 3'
Guide sequence insert 1 Reverse	5'AAACCCTTCCATAGTCTCCAAATAATC 3'
Guide sequence insert 2 Forward	5' CACCCCACTCTAGTACTATATCTGTCA 3'
Guide sequence insert 2 Reverse	5'AAACTGACAGATATAGTACTAGAGTGG 3'

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Interleucina-8 é uma quimiocina pró-inflamatória, sendo que a maioria dos artigos publicados indica maior expressão do gene da *IL8* no tecido gengival de indivíduos com doença periodontal em relação a indivíduos saudáveis^{1, 4, 10, 45}. No entanto, a literatura não é concordante quanto aos níveis da proteína IL-8 no fluido crevicular gengival (FCG)^{5, 9, 20, 42, 49} e saliva^{24, 34} de indivíduos com doença periodontal. Apesar da maioria dos trabalhos parecerem demonstrar que níveis mais elevados de IL-8 foram encontrados em fluido crevicular gengival de pacientes com doença periodontal, quando alguns desses trabalhos foram selecionados para realização de uma meta-análise, foi observado que em FCG de indivíduos com DP, menores níveis de IL-8 são obtidos. Acredita-se que variações entre os estudos influenciam os resultados obtidos, principalmente em relação aos critérios considerados para definir um paciente como afetado ou não pela doença periodontal, o método de coleta do GCF e análise da citocina. Apesar de parecer estranho os níveis de IL-8 estarem diminuídos no FCG de pacientes com DP, há informações na literatura relatando a degradação da Interleucina-8 por substâncias na membrana de periodontopatógenos como o *P. gingivalis*⁵⁰. Sendo esse microrganismo altamente presente em condições periodontais, a degradação da proteína dificultaria sua detecção em fluidos, mesmo o gene *IL8* sendo expresso e a proteína sendo liberada para o GCF.

Um outro fator importante em relação à produção de citocinas é a influência genética individual exercida por polimorfismos em seus genes. Dessa forma investigamos a possível influência que os mencionados haplótipos no gene *IL8* podem ter na expressão do próprio gene *IL8* e de outros genes do sistema imune. Isso foi realizado em células da

resposta imune inata e adaptativa provenientes de pacientes que carregavam os haplótipos de interesse submetidas a estímulos inflamatórios e periodontopatogênicos, como a presença de *Aa* e *Pg*. Foi verificado que alguns tipos celulares carregando o haplótipo ATC/TTC, previamente associado à suscetibilidade à Doença Periodontal, perante tais estímulos microbianos expressaram níveis significativamente maiores de alguns genes quando comparado aos mesmos tipos celulares com o haplótipo ATT/TTC que não tinha sido associado à DP.

Ao aprofundamos a investigação da funcionalidade dos haplótipos no gene *IL8* por meio do sistema CRISPR-Cas9-HRD verificamos que células de linhagem editadas com o haplótipo 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. Este foi o primeiro estudo que investigou a funcionalidade simultânea de 3 polimorfismos no gene *IL8*, formando um haplótipo, no contexto da doença periodontal, apesar de outros estudos terem sido realizados com outras linhagens celulares, investigando um único SNP (Hull et al., 2000) ou incluindo mais SNPs além dos presentemente investigados ²². Nota-se que a funcionalidade de SNPs é dependente do tipo celular investigado e dos estímulos a que este é submetido.

CONCLUSÃO

- Considerando o exposto no Capítulo 1, conclui-se que a expressão do gene *IL8* foi maior em pacientes com periodontite crônica em relação a indivíduos periodontalmente saudáveis, embora os níveis proteicos de IL-8 no fluido crevicular gengival e na saliva foram variáveis conforme os estudos avaliados, incluindo os resultados da metanálise realizada.
- Considerando os resultados dos Capítulos 2 e 3, conclui-se que o haplótipo ATC/TTC no gene *IL8* previamente associado com suscetibilidade à DP mostrou-se funcional por influenciar, em células da imunidade inata e adaptativa obtidas de pacientes, a expressão de genes do sistema imune; além de aumentar, em células de linhagem editadas com tal haplótipo, o recrutamento de neutrófilos ao produzir mais IL-8. Esses resultados foram verificados comparando-se o citado haplótipo ATC/TTC no gene *IL8* (previamente associado com suscetibilidade à DP) com o haplótipo ATT/TTC (que não tinha sido associado à DP), submetendo as células carregando cada haplótipo aos mesmos estímulos inflamatórios e microbianos.

REFERÊNCIAS

1. 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(6): 893-9.
 2. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*. 1993; 64(5 Suppl): 456-60.
 3. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Porphyromonas gingivalis-induced inflammatory mediator profile in an ex vivo human whole blood model. *Clin Exp Immunol*. 2006; 143(1): 50-7.
 4. 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(2): 184-91.
 5. Chen YW, Umeda M, Nagasawa T, Takeuchi Y, Huang Y, Inoue Y, et al. Periodontitis may increase the risk of peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2008; 35(2): 153-8.
 6. Chung RM, Grbic JT, Lamster IB. Interleukin-8 and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 1997; 24(3): 146-52.
 7. Cook DJ, Mulrow CD, Haynes RB. Systematic reviews: synthesis of best evidence for clinical decisions. *Ann Intern Med*. 1997; 126(5): 376-80.
 8. 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.
-

9. Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, et al. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol*. 2010; 81(7): 1056-63.
10. Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Parada CA, Casati MZ, Nociti FH, Jr. Overexpression of interleukin-1beta and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Periodontal Res*. 2007; 42(4): 377-81.
11. Findlay GM, Boyle EA, Hause RJ, Klein JC, Shendure J. Saturation editing of genomic regions by multiplex homology-directed repair. *Nature*. 2014; 513(7516): 120-3.
12. Finoti LS, Anovazzi G, Pigossi SC, Corbi SC, Teixeira SR, Braidó 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.
13. Finoti LS, Corbi SC, Anovazzi G, Teixeira SR, Capela MV, Tanaka MH, et al. Pathogen levels and clinical response to periodontal treatment in patients with Interleukin 8 haplotypes. *Pathog Dis*. 2013; 69(1): 21-8.
14. 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.
15. Fitzgerald JE, Kreutzer DL. Localization of interleukin-8 in human gingival tissues. *Oral Microbiol Immunol*. 1995; 10(5): 297-303.

16. Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1): 32-8.
17. Gainet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Lab Invest*. 1998; 78(6): 755-62.
18. 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. *J Periodontol*. 2000; 71(10): 1535-45.
19. Garlet GP, Martins W, Jr., Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2003; 38(2): 210-7.
20. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(12): 1046-52.
21. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-6 and interleukin-8 levels in chronic periodontitis. *Int J Dent*. 2012; 2012: 362905.
22. 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 Immun*. 2004; 5(4): 274-82.

23. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994; 5: 78-111.
24. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics*. 2007; 4(4): 531-8.
25. 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.
26. 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.
27. Johnson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. *J Dent Educ*. 2001; 65(4): 313-21.
28. Konopka L, Pietrzak A, Brzezinska-Blaszczyk E. Effect of scaling and root planing on interleukin-1beta, interleukin-8 and MMP-8 levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res*. 2012; 47(6): 681-8.
29. Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedachi M, Nozaki T, et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. *J Periodontol*. 2004; 75(3): 370-9.
30. Linden GJ, Mullally BH, Freeman R. Stress and the progression of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1996; 23(7): 675-80.

31. Loos BG, Leppers-Van de Straat FG, Van de Winkel JG, Van der Velden U. Fcgamma receptor polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(7): 595-602.
32. Mealey BL. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. *Compend Contin Educ Dent*. 2000; 21(11): 943-6, 8, 50, passim; quiz 56.
33. Michalowicz BS, Ronderos M, Camara-Silva R, Contreras A, Slots J. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. *J Periodontol*. 2000; 71(6): 981-8.
34. Miller CS, King CP, Jr., Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc*. 2006; 137(3): 322-9.
35. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998; 9(3): 248-66.
36. Pearson A, Wiechula R, Court A, Lockwood C. The JBI model of evidence-based healthcare. *Int J Evid Based Healthc*. 2005; 3(8): 207-15.
37. 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.
38. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SR. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(6): 443-8.

39. Shapira L, Borinski R, Sela MN, Soskolne A. Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1991; 18(1): 44-8.
40. Shapira L, Wilensky A, Kinane DF. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 Suppl 6: 72-86.
41. Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect Immun.* 1992; 60(11): 4932-7.
42. Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol.* 2010; 81(1): 89-98.
43. Teles RP, Sakellari D, Konstantinidis A, Socransky SS, Haffajee AD. Application of the checkerboard immunoblotting technique to the quantification of host biomarkers in gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 2009; 80(3): 447-56.
44. Trombone AP, Cardoso CR, Repeke CE, Ferreira SB, Jr., Martins W, Jr., Campanelli AP, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308G/A single nucleotide polymorphism and red-complex periodontopathogens are independently associated with increased levels of tumor necrosis factor-alpha in diseased periodontal tissues. *J Periodontal Res.* 2009; 44(5): 598-608.

45. 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(1): 99-108.
46. Wang D, Sadee W. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). *AAPS J.* 2006; 8(3): E515-20.
47. Wieseler B, McGauran N. Reporting a systematic review. *Chest.* 2010; 137(5): 1240-6.
48. Wolf DL, Neiderud AM, Hinckley K, Dahlen G, van de Winkel JG, Papapanou PN. Fcγ receptor polymorphisms and periodontal status: a prospective follow-up study. *J Clin Periodontol.* 2006; 33(10): 691-8.
49. Yamazaki K, Honda T, Oda T, Ueki-Maruyama K, Nakajima T, Yoshie H, et al. Effect of periodontal treatment on the C-reactive protein and proinflammatory cytokine levels in Japanese periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 2005; 40(1): 53-8.
50. Zhang J, Dong H, Kashket S, Duncan MJ. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. *Microb Pathog.* 1999; 26(5): 275-80.

APÊNDICE

APÊNDICE A- METODOLOGIA DETALHADA - CAPÍTULO 1

As etapas percorridas na elaboração desta meta-análise foram: formulação da pergunta de pesquisa; elaboração dos critérios de inclusão e exclusão dos estudos; detalhamento da estratégia de busca para seleção dos estudos; avaliação dos estudos; extração dos dados; análise e síntese dos estudos relevantes; apresentação dos resultados; interpretação, limitação e aplicabilidade dos resultados.

- **Definição da pergunta de pesquisa**

Uma revisão sistemática definida e focada inicia-se com uma pergunta de pesquisa bem formulada. Dessa forma, a questão de pesquisa formulada no presente trabalho integrou a primeira etapa na elaboração deste estudo, a qual foi o alicerce da busca das publicações. Formulou-se a seguinte pergunta ***"Indivíduos com doença periodontal crônica apresentam diferentes níveis de Interleucina- em comparação com indivíduos sem a doença?"***

- **Determinação dos critérios para inclusão dos estudos**

Para definição dos artigos elegíveis para a revisão foram considerados os seguintes critérios para inclusão: estudo original com resumo disponível; publicado em inglês; estudos clínicos em humanos; perfil de citocinas (interleucina-8) no fluido crevicular gengival, saliva e tecidos de pacientes com e sem periodontite crônica. Artigos originais de pesquisa que não conseguiram acompanhar todos os critérios acima descritos

foram excluídos da meta-análise. Além disso, foram excluídas cartas ao editor, patentes, e artigos de revisão, além de artigos que utilizavam a mensuração da interleucina-8 em amostras de sangue.

- **Busca dos estudos**

A próxima etapa para realização da revisão sistemática foi a busca dos estudos, com prévia elaboração de uma estratégia de pesquisa detalhada, incluindo as bases de dados pesquisadas e os termos de busca que foram utilizados (Tabela 1).

Tabela 1 - Estratégia de busca e números de estudos identificados nas bases de dados eletrônicas

Base de Dados	Estratégia de Busca	Número de Estudos
Medline/Pubmed http://www.pubmed.gov	Interleukin-8 and Periodontal Disease	171
	Interleukin-8 and Periodontitis	322
	IL-8 and Periodontal Disease	237
	IL-8 and Periodontitis	445
SCOPUS http://www.scopus.com/home.url	Interleukin-8 and Periodontal Disease	413
	Interleukin-8 and Periodontitis	510
	IL-8 and Periodontal Disease	303
	IL-8 and Periodontitis	380
Web of Science http://apps.webofknowledge.com/	Interleukin-8 and Periodontal Disease	407
	Interleukin-8 and Periodontitis	372
	IL-8 and Periodontal Disease	470
	IL-8 and Periodontitis	425

Após a busca dos estudos, os mesmos foram exportados para o programa de gerenciamento de referências bibliográficas EndNote® versão X7 (Thomson Reuters, Nova York, NY, USA), com a criação de um arquivo para cada base de dados. Esse programa armazena as seguintes informações relativas aos estudos: título, autor, periódico, ano, volume, número, páginas, seção, resumo e palavras-chave. A exportação eletrônica possibilitou a construção de uma planilha única com 4.445 artigos, que posteriormente permitiu a remoção dos artigos duplicados (n=3.511). A partir daí, obteve-se um arquivo com estudos únicos (n=944), os quais foram analisados por título e resumo.

- **Avaliação do risco de viés nos estudos incluídos (Avaliação dos estudos)**

Após a identificação dos potenciais estudos, realizou-se a leitura dos títulos e resumos (n=944). Esta etapa foi realizada de modo independente, por dois investigadores, os quais optavam pela inclusão ou exclusão destes estudos pré-selecionados, baseados no atendimento de critérios pré-estabelecidos, devendo estes serem cumpridos na sua totalidade. Nos casos em que a avaliação, por título e resumo, dos investigadores não foi suficiente para decidir pela inclusão ou não do artigo, um terceiro revisor foi consultado. A partir da pré-seleção dos artigos, por título e resumo, partiu-se para a leitura do texto integral (n=85), visando à análise mais refinada do conteúdo a fim de selecionar os artigos objeto de análise da revisão sistemática.

Dentre os estudos, duas diferentes unidades de medida foram utilizadas para quantificar os níveis de IL-8: pg/sítio e pg/ul.

- **Análise dos dados e realização de meta-análise (Coleta dos dados)**

Os dados foram extraídos de forma independente por dois pesquisadores para reduzir o risco de erro de transcrição. As informações foram armazenadas em banco de dados EXCELL 2011® e posteriormente exportadas para o programa Review Manager [RevMan] Versão 5 (Copenhague: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2011). Bax MIX 2.0) no qual executou-se a meta-análise.

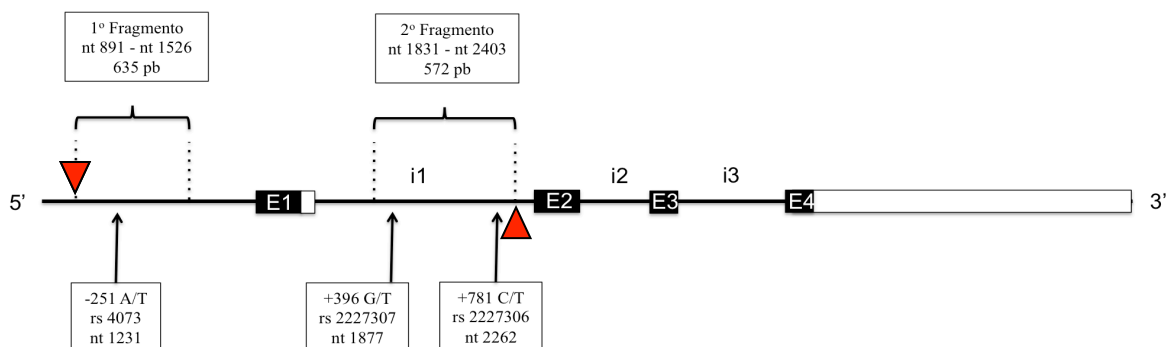
Foram utilizados os testes Q^2 e o índice I^2 para avaliar a heterogeneidade entre os estudos, a qual aponta a variação existente entre eles ilustrando as diferenças metodológicas ou clínicas existentes. No presente trabalho, considerou-se no teste de heterogeneidade o $p > 0,1$ para o teste de Q^2 , e os valores de I^2 segundo a classificação da heterogeneidade em baixa (I^2 abaixo de 0,25), moderada (I^2 de 0,25 a 0,50) e grande (I^2 acima de 0,50). O modelo de efeito fixo (método de Mantel-Haenszel) foi utilizado quando nenhuma evidência de heterogeneidade foi detectada nos resultados. Em caso de heterogeneidade detectada nos resultados, um modelo de efeitos aleatórios (método Der Simonian-Laird) foi aplicado. O gráfico tipo forest-plot foi utilizado para resumir as estimativas.

APÊNDICE B - METODOLOGIA DETALHADA - CAPÍTULO 2

- **Procedimentos para confirmação dos haplótipos dos polimorfismos do gene *IL8***

Para confirmar os genótipos/haplótipos dos pacientes foram realizadas novas ampliações por PCR para regiões específicas do gene *IL8* (Figura 1) usando o DNA já doados por pacientes nos projetos anteriores.

Figura 1 - 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).



Em seguida, as bandas correspondentes aos respectivos PCRs foram purificadas de gel de agarose e encaminhados para sequenciamento. Assim, foram confirmados os alelos verificados nos nossos estudos anteriores que tinham sido determinados por *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

1º Fragmento do gene IL8: Compreende o polimorfismo -251 (A/T), rs4073. Essa região foi amplificada por PCR, 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’

Condições da PCR gerando um amplicon de 635pb: Volume final da reação de 20uL. Tampão 10x PCRx; 200 µM dNTP, 0,20 µM cada primer, 1,5 mM MgSO₄, 1,75U Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 0,5x PCRx Enhancer, 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.

2º Fragmento do gene IL8: Compreende o polimorfismo na base +396 G/T e o polimorfismo na base +781 C/T. Essa região foi amplificada por PCR, utilizando 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’

Condições da PCR gerando um amplicon de 572pb: Volume final da reação de 20uL. Tampão 10xPCR; 200 µM dNTP, 0,30 µM cada primer, 1,5 mM MgSO₄, 1,7U Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 0,5x PCRxEnhancer, 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.

- **Purificação dos produtos da PCR de *IL8* e Sequenciamento das amostras**

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™), 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 (Nanovue Plus, GE Healthsciences), 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).

- **Descrição da Amostra para o gene *IL8***

Após aprovação deste projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOAr – UNESP (CAAE 18527813.7.0000.5416), foram contatados 12 indivíduos acima de 23 anos, não importando o gênero ao qual pertencem nem a etnia, que possuísem:

-Haplótipo que confere suscetibilidade à DP: ATC/TTC (n=6)

-Haplótipo que não confere suscetibilidade à DP: ATT/TTC (n=6)

Cabe acrescentar que esse número de 6 indivíduos para cada haplótipo foi obtido de um 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 que foram realizados com o sangue doado pelos pacientes que possuem 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 inata e adaptativa.

De cada voluntário foi coletado sangue periférico para separação de neutrófilos, monócitos e linfócitos T. Foram realizados experimentos em que tais células dos pacientes receberam estímulos com bactérias Gram-negativas associadas à doença periodontal (*P.gingivalis*, cepa ATCC 33277; *A.actinomycescomitans*, cepa JP2) e como controles positivos (PMA, IL-1 β).

Considerando a interação microbiota/hospedeiro, foi avaliado se esses haplótipos influenciavam a regulação da expressão gênica de *IL8* em nível de RNAm. Os estímulos, conforme descrição na Tabela 2, foram realizados para os diferentes tipos celulares e permitiram as avaliações de expressão gênica por RT-qPCR.

Tabela 2 - Experimentos e estímulos (período/concentrações) realizados para linfócitos T, monócitos e neutrófilos.

Experimento	Nº Células (por poço)	Período Estímulo	Estímulos (concentração)
-------------	-----------------------	------------------	--------------------------

RT-qPCR (RNAm)	2×10^6	4 h	- Controle negativo - PMA (50 ng/ml) - IL-1 beta (5 ng/ml) - Co-cultura <i>P.gingivalis</i> - Co-cultura <i>A.actinomycetemcomitans</i>
-------------------	-----------------	-----	---

• **Metodologia de cultivo *Pg* e *Aa***

Todas as cepas foram mantidas em caldo BHI (brain heart infusion) contendo 20% de glicerol em freezer a -80 °C. As amostras de *P. gingivalis* (*Pg*) foram cultivadas em placas de ágar sangue (sangue desfibrinado de carneiro) suplementado com hemina (0,5 mg/ml) e menadione (1 mg/ml) (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) e em jarra sob atmosfera de anaerobiose (GasPack™ EZ Anaerobe Container System with Indicator, BD) em estufa de 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 µg ml⁻¹) por 24 horas, seguindo-se da diluição 1:40 no mesmo meio de incubação até atingir a DO_{495nm} ~ 0,5.

As amostras de *A. actinomycetemcomitans* foram cultivadas em placas de ágar com meio TSB e em jarra sob atmosfera de anaerobiose (GasPack™ EZ Anaerobe Container System with Indicator, BD) em estufa a 37° C durante 48 horas. Para obter culturas de *A. actinomycetemcomitans* em fase exponencial de crescimento, a amostra foi cultivada em caldo TSB e incubada durante 24 horas em jarra com atmosfera de 10% de CO₂ dada pelo envelope GasPak™. Após este intervalo de tempo, a concentração da suspensão bacteriana foi ajustada por mensuração em espectrofotômetro à DO_{495 nm} para ~1,0; seguindo-se à diluição 1:40 em caldo TSB e incubação por 7 horas.

- **Coleta e separação das células do sangue periférico**

O sangue periférico doado pelos voluntários, após coleta 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 (700 g por 30 min, à temperatura ambiente, com ajuste de aceleração mínima ($a=2$) e sem *brake* ($b=0$)). Após a centrifugação foram formadas três camadas: a superior contendo células mononucleares, a intermediária os neutrófilos, e a camada inferior os eritrócitos.

Após a separação inicial de PMNs/neutrófilos de células mononucleares em gradiente de densidade, os neutrófilos foram plaqueados de acordo com a Tabela 1 (que descreve os estímulos). A partir dos PBMCs foram separados linfócitos T e monócitos com kits de isolamento magnético. Esta etapa de separação celular foi realizada utilizando kits comercialmente disponíveis de beads magnéticos conjugados à coquetel de anticorpos para antígenos de superfície que possibilitam a separação negativa de linfócitos T e monócitos por meio da depleção dos outros tipos celulares (Dynabeads Untouched Human Monocytes e Dynabeads Untouched Human T cells, Invitrogen Corp.), de forma que os tipos celulares de interesse estivessem 'intocados' (i.e., sem anticorpos/beads na sua superfície). A população de células mononucleares separadas por centrifugação em Histopaque foram lavadas, ressuspensas e contadas utilizando azul de trypan para identificação de células mortas. Duas alíquotas foram preparadas e para

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

- **Avaliação da expressão gênica (RT-qPCR)**

Os estímulos utilizados foram aqueles apresentados na Tabela 2, de modo que foi investigada a expressão dos genes-alvo indicados na Tabela 3 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 3 - 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

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 moloney leukemia vírus reverse transcriptase, segundo as instruções do fornecedor do kit (High CapacityRT kit, Applied Biosystems).

- **PCR em Tempo Real ou quantitativo (RT-qPCR)**

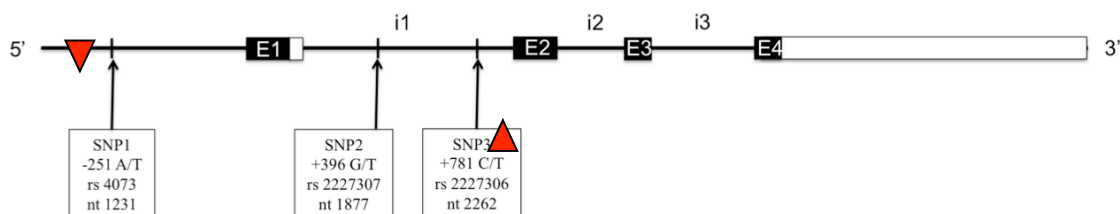
A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando conjuntos de primers e sondas pré-desenhados (Gene expression assays, Applied Biosystems) para detecção dos genes-alvo (*IL4*, *IL8*, *TNFA*, *IL12a*) e do gene constitutivo (*GAPDH*) por meio do sistema TaqMan (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems). A reação foi realizada a partir de: 10 μ L de *TaqMan Fast Advanced Master Mix* 2x, 1,0 μ L 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 60C). 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 (ΔCt). 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.

APÊNDICE C - METODOLOGIA DETALHADA - CAPÍTULO 3

Esta metodologia foi realizada graças à parceria estabelecida com o Dr. Denis F. Kinane da *University of Pennsylvania* durante o período de estágio de Doutorado Sanduíche. A avaliação da funcionalidade dos haplótipos no gene *IL8* foi realizada por meio do sistema CRISPR-Cas9-HDR. A sigla significa *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, ou cluster de repetições palindrômicas curtas regulares intercaladas. Associado ao CRISPR-Cas9 foi utilizado o Reparo Direcionado por Homologia (HDR, *Homology-Directed Repair*). Por meio desse sistema é possível realizar uma edição engenheirada do gene *IL8*, de modo a se obter uma linhagem celular contendo toda a sequência de DNA com a presença dos SNPs que formam os haplótipos sob investigação (Figura 2).

Figura 2 - Esquema do gene *IL8* com destaque para a região que contém os polimorfismos -251 (A/T), +396 (G/T) e +781 (C/T).



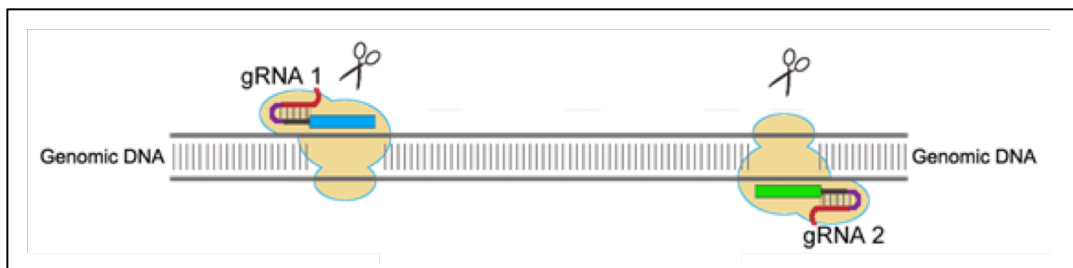
A sequência original de pacientes da região destacada entre os triângulos vermelhos substituirá a mesma sequência de DNA natural da linhagem celular humana. Dessa forma, será possível conhecer se cada haplótipo mencionado influencia a expressão

do gene *IL8*, o nível protéico e o recrutamento de neutrófilos do modo mais próximo possível ao que ocorre na realidade.

O sistema CRISPR/Cas é um excelente método para edição de genes. Algumas bactérias possuem tais trechos repetitivos de DNA como parte de um sistema imune adaptativo contra vírus chamados bacteriófagos. Para combater esses vírus, tais bactérias utilizam uma proteína Cas9 que atua em conjunto com o CRISPR, reconhecendo e “cortando” o DNA do vírus de maneira análoga à ação do RNAi em organismos eucarióticos⁴.

O sistema CRISPR/Cas utiliza um RNA "guia" (gRNA) desenhado de modo a se anelar à sequência de DNA desejada para “edição” da sequência alvo específica (região do gene que se deseja modificar) para trazer a proteína Cas9 que clivará o DNA nessa região (Figura 3).

Figura 3 - RNA “guia” reconhecendo a região específica do DNA a ser clivado pela Cas9



No caso do nosso estudo, no sistema CRISPR-Cas9 o gRNA1 teve que ser correspondente à uma região anterior ao primeiro SNP (-251), bem como o gRNA2 à uma região posterior ao terceiro SNP (+781) do gene *IL8*, conforme destacado pelos

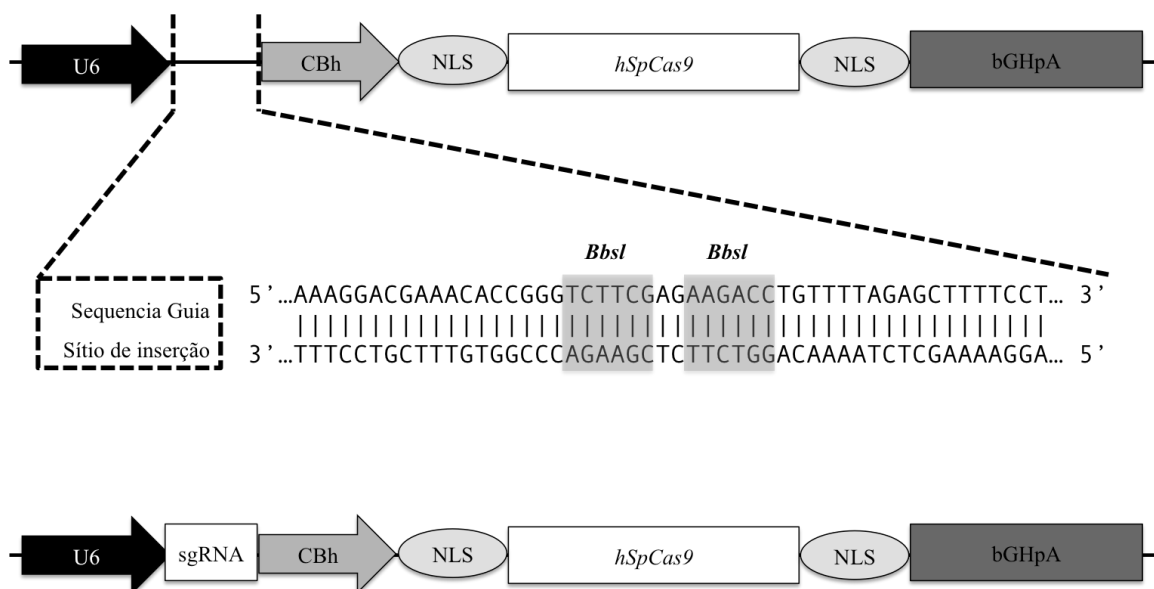
triângulos vermelhos na Figura 2. Sendo assim, foram desenhados os seguintes pares de primers para confecção dos RNAs guias:

Tabela 4 - Sequencia dos primers para confecção dos RNAs guias

Sequencia guia 1 Forward	5' CAACCGATTATTTGGAGACTATGGAAGG 3'
Sequencia guia 1 Reverse	5' CAACCGATTATTTGGAGACTATGGAAGG 3'
Sequencia guia 2 Forward	5' CACCCCACTCTAGTACTATATCTGTCA 3'
Sequencia guia 2 Reverse	5'AAACTGACAGATATAGTACTAGAGTGG 3'

Após a confecção dos gRNAs tivemos que inserir suas sequências no plasmídeo do sistema CRISPR-Cas9 (Figura 4). Vale ressaltar que tivemos que produzir 2 plasmídeos: um com a inserção do sgRNA1 e outro com a inserção do sgRNA2.

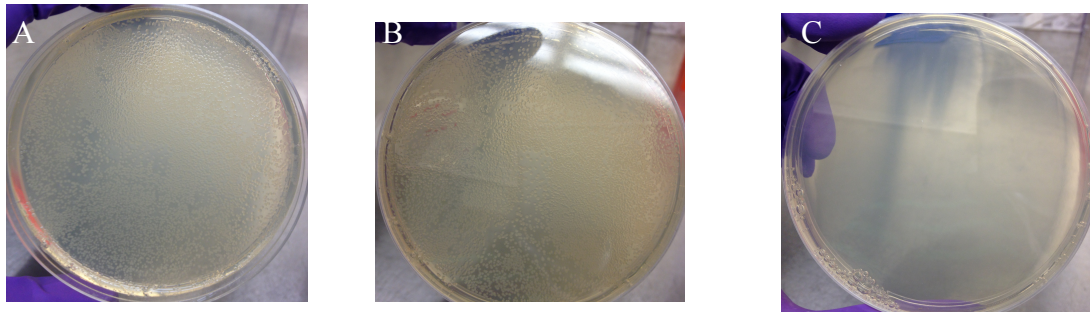
Figura 4 - Plasmídeo contendo a Cas9 usado para clonar as sequências de RNA guia (gRNA)



Após o tratamento com a enzima de restrição *BbsI* por 12 horas, o par de primers hibridados foi inserido no plasmídeo. Após esse processo foi realizada a clonagem por meio da transformação de *E. coli*. O plasmídeo é resistente à ampicilina. Sendo assim adicionamos ampicilina ao meio LB para realização da clonagem.

Para as placas em que a transformação das bactérias pelos plasmídeos ocorreu com sucesso, observam-se colônias (Figura 5 A e B). Já na placa na qual foram cultivadas bactérias com transformação controle, sem plasmídeo resistente à ampicilina, não foi observado o crescimento de nenhuma colônia bacteriana (Figura 5 C).

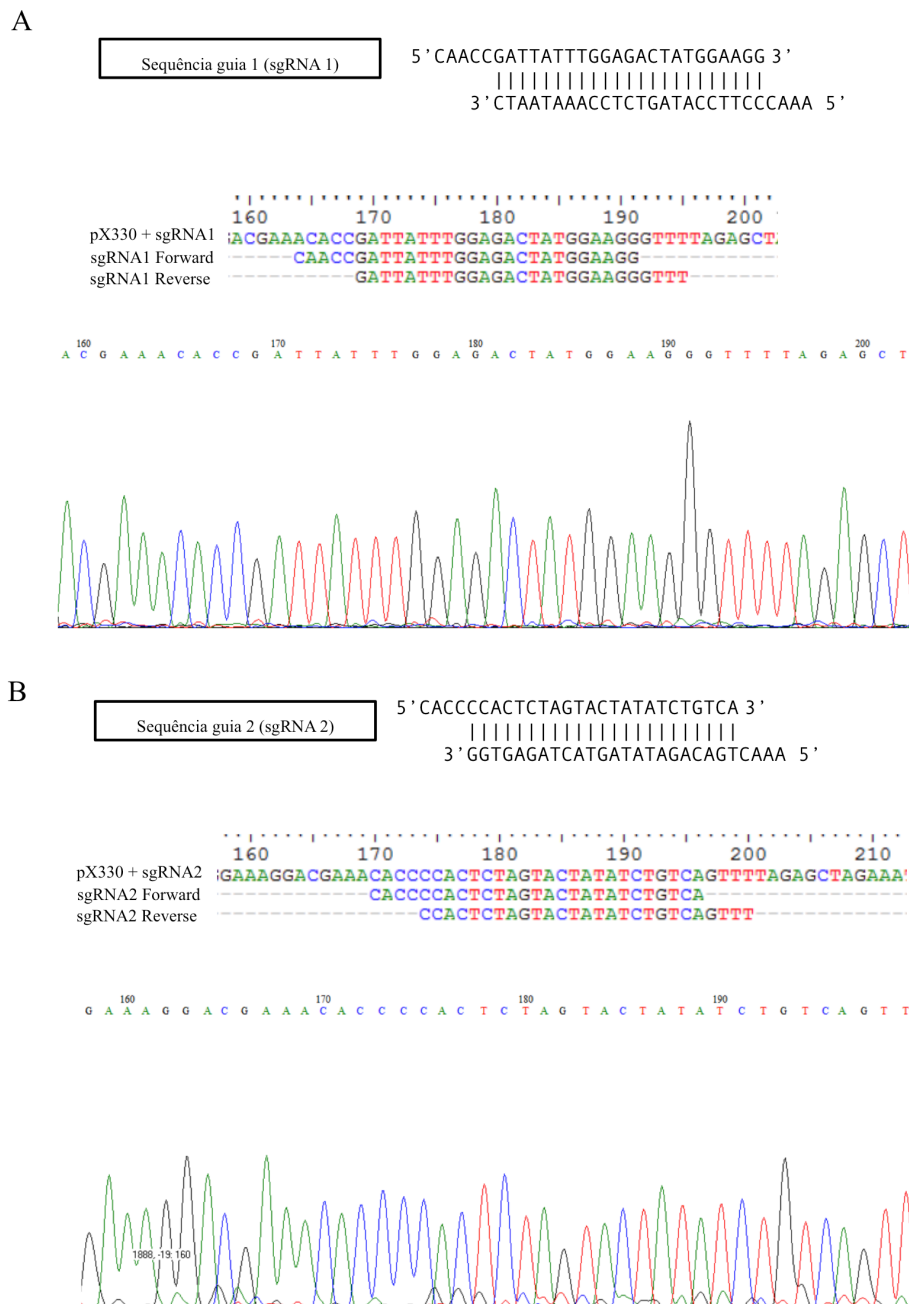
Figura 5 - A- Crescimento das *E. coli* após transformação com os plasmídeos com a inserção dos pares hibridizados de gRNA 1. **B-** idem para gRNA2. **C-** transformação controle (somente *E. coli*)



Ao final do processo de clonagem, os plasmídeos foram extraídos das *E. coli* por meio do Kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep. Foi realizado o sequenciamento utilizando o primer F da região U6 do promotor do plasmídeo, região próxima à inserção dos gRNAs (Figura 4), para confirmação da inserção de cada RNA guia em seu respectivo plasmídeo.

Utilizando ferramentas de Bioinformática as sequencias do gRNA1 e do gRNA2 (Primers F e R de ambos) foram aneladas ao resultado do sequenciamento, e a inserção de cada uma ao plasmídeo foi confirmada (Figura 6 A e B).

Figura 6 - Resultado dos sequenciamentos com as respectivas sequencias aneladas confirmando a inserção do RNA guia no plasmídeo (**A.** gRNA1; **B.** gRNA2)



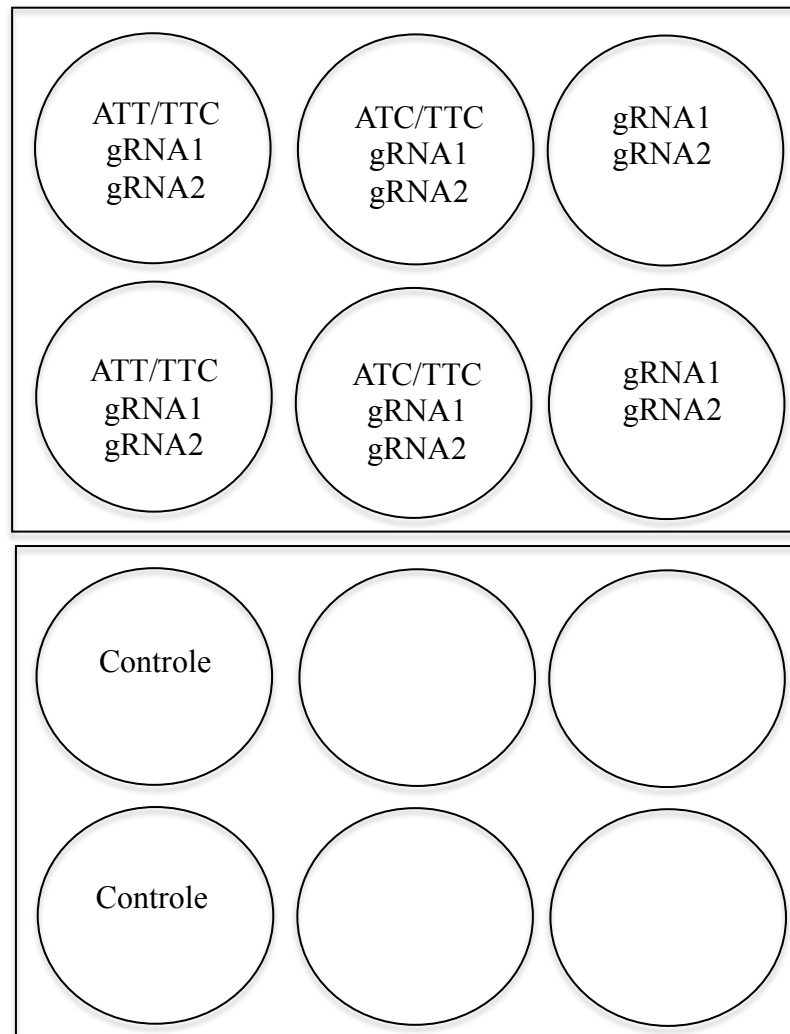
Para edição engenheirada do gene *IL8*, além do sistema CRISPR-Cas9, foi necessário utilizar o Reparo Direcionado por Homologia (HDR, *Homology-Directed Repair*). Este é baseado no mecanismo natural das células para reparar quebras de dupla fita do DNA (principalmente na fase S e G2 do ciclo celular). A célula somente consegue utilizar esse mecanismo quando há um trecho de DNA disponível para a célula que seja homólogo àquele ausente ⁶.

Assim, concomitantemente à produção dos plasmídeos CRISPR-Cas9 contendo os gRNA, foi necessário obter a sequência do gene *IL8* que contém o(s) haplótipo(s) sob investigação (Figura 2, delimitado pelos triângulos). Com o DNA de pacientes confirmados por sequenciamento contendo os haplótipos ATT/TTC ou ATC/TTC foi realizada uma reação de PCR para amplificação do fragmento correspondente a toda região compreendida pelo haplótipo do gene *IL8*. Em seguida, foi realizada a purificação desse fragmento após eletroforese em gel de agarose. Esse produto do PCR purificado que é a sequência de DNA correspondente à cada haplótipo foi reservado para ser utilizado na próxima etapa.

Uma vez confirmada a obtenção do: (1) sistema CRISPR-Cas9 (plasmídeo com a proteína Cas9 e cada RNA guia específico para as extremidades que flanqueiam a região do haplótipo), e (2) produto purificado do PCR contendo a sequência dos haplótipos ATT/TTC ou ATC/TTC do gene *IL8*, foi possível realizar a edição do gene *IL8* por meio do Sistema CRISPR-Cas9-HDR. A linhagem celular escolhida por nosso parceiro no exterior foi a HEK 293 (células embrionárias de rim humano), largamente utilizadas em biologia molecular, inclusive para produção de proteínas terapêuticas por terapia genética.

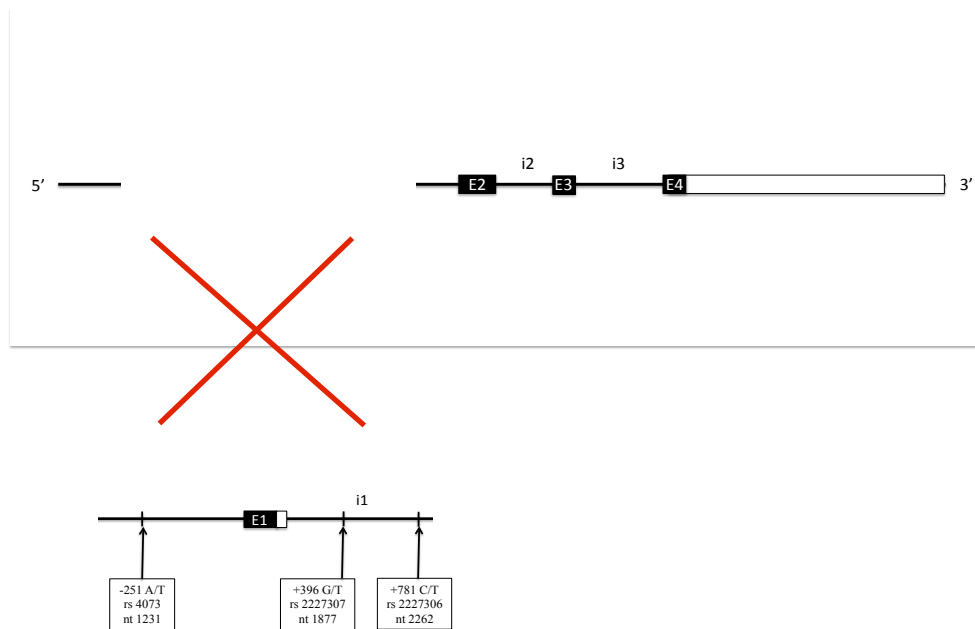
Para edição engenheirada do gene *IL8* das células da linhagem HEK 293 por meio do Sistema CRISPR-Cas9-HDR, foi realizada uma transfecção utilizando o kit Attractene Transfection Reagen QIAGEN ®. Nesse processo, formou-se um ‘vacúolo’ contendo uma combinação dos plasmídeos CRISPR-Cas9 e as sequências dos haplótipos (ATT/TTC ou ATC/TTC) do gene *IL8* (conforme esquematizado na Figura 7) que foi transfectado nas células HEK 293 em placas de cultivo celular.

Figura 7 - Esquema representando placas de cultivo celular contendo células HEK 293 (duplicata) transfectadas com: haplótipo ATT/TTC + gRNA1+gRNA2; haplótipo ATC/TTC + gRNA1 + gRNA2; somente gRNA1 + gRNA 2 e células controle (sem transfecção).



O processo biológico que ocorre após a transfecção é explicitado a seguir: cada gRNA do CRISPR irá se alinhar às extremidades do gene *IL8* (contendo o haplótipo de interesse) da célula HEK 293, devido à sua complementaridade da sequência. Isso direciona a proteína Cas9 do complexo CRISPR que cliva tais extremidades do gene *IL8* da célula HEK 293 de modo preciso. Essa sequência, agora ausente, do gene *IL8* da célula HEK 293, será substituída pela sequência original do gene *IL8* contendo o haplótipo ATT/TTC ou ATC/TTC (obtida de um paciente). Esse processo biológico que promove tal substituição é o HDR (Figura 8) ⁷.

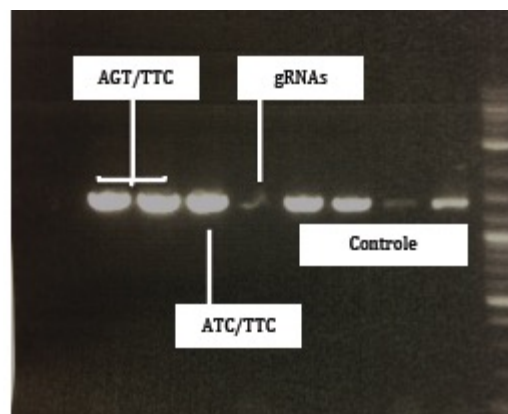
Figura 8 - Substituição de parte da sequência do gene *IL8* da célula HEK 293 pela sequência de DNA (originária de um paciente) contendo o haplótipo sob investigação. Processo HDR.



Para confirmar se houve sucesso na transfecção, após 72 horas de transfecção, o DNA das células HEK 293 foi extraído com o “Blood & Cell Culture DNA Mini Kit – QIAGEN®” de acordo com as recomendações do fabricante. Uma reação de PCR foi

realizada com o par de primers específico para a região do gene *IL8* editada. Seguindo o esquema da Figura 6, nos poços da placa em que não foram colocadas sequencias de DNA contendo o haplótipo, era esperado que não houvesse aparecimento de banda como resultado da reação de PCR. Já nos poços em que foi transfectado somente o plasmídeo com a proteína Cas9 não era esperado verificar a presença de banda como produto da PCR. Isso porque não há a presença da sequencia de DNA do gene *IL8* para os primers se anelarem. Na Figura 9 pode-se observar que foi confirmado o sucesso da transfecção conforme esquematizado na Figura 6.

Figura 9 - Resultado da PCR para confirmação da transfecção nas células Hek 293 do gene *IL8* editado.



Como próxima etapa, as células HEK 293 transfectadas com cada plasmídeo (contendo os haplótipos ATT/TTC **ou** ATC/TTC do gene *IL8*) foram submetidas à estímulo por poli I: C, um agonista de TLR3 capaz de induzir a expressão de IL-8¹. Para realizar a análise funcional, as células HEK293 que foram editadas e, juntamente com as células de controle, foram cultivadas em placas de seis poços a 70-80% de confluência com meio de cultura pré-aquecido (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino

dialisado e 1% de penicilina/estreptomicina), e levadas à incubadora com 5% de CO₂ a 37 ° C. Um total de $0,5 \times 10^6$ células foram estimuladas com poli I: C de 5 ug/mL durante 24 h. Seis condições foram estabelecidas: 1) Células HEK293T com haplótipo ATT/TTC estimuladas com agonista de TLR3 poli I:C; 2) Células HEK293T com haplótipo ATC/TTC estimuladas com agonista de TLR3 poli I:C; 3) Células HEK293T estimuladas com agonista de TLR3 poli I:C; 4) Células HEK293T com haplótipo ATT/TTC não estimuladas; 5) Células HEK293T com haplótipo ATC/TTC não estimuladas; 6) as células HEK293T não-estimuladas. Subsequentemente, experimentos foram realizadas para a avaliação da expressão do gene *IL8*, a quantificação de IL-8, proteína e migração de neutrófilos.

- **Ensaio de Migração de Neutrófilos**

Neutrófilos humanos foram isolados de voluntários saudáveis com a aprovação do comitê de ética da Universidade da Pensilvânia. Cinco mililitros de sangue total foram obtidos por punção venosa em tubos contendo heparina de sódio (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os neutrófilos foram isolados de acordo com Nauseef, 2014 ⁵. Os neutrófilos foram lavados várias vezes, e ressuspensos em meio DMEM pré-aquecido.

Em relação ao ensaio de transmigração, foi realizada uma adaptação de um protocolo anteriormente descrita ³. O ensaio foi conduzido em uma câmara modificada de 24 poços (Corning Incorporated, NLD). Oitocentos microlitos de cada sobrenadante das células estimuladas e não estimuladas foram colocados em cada poço. O recombinante humano de IL-8 (R&D Systems, Minneapolis, MN) foi utilizado como controle positivo, como sim o meio DMEM puro foi usado com controle negativo. Subsequentemente

1×10^6 dos neutrófilos isolados foram adicionados à parte superior (basolateral) da câmara. O conjunto foi incubado à 37° durante 2 horas. Os neutrófilos que migraram para a câmara inferior foram quantificadas por fluorescência de células ativadas (FACs) usando o citômetro de fluxo BD Accuri™ C6.

- **Análise da Expressão Gênica**

O RNA total de cada condição foi isolado utilizando o kit RNeasy (Qiagen, Silicon Valley, CA) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade e concentração de RNA foram verificados por espectrometria por meio do NanoDrop ND1000. As leituras no Nanodrop mostraram que as amostras extraídas de RNA apresentavam concentração suficiente e qualidade adequada para realização do qPCR. Cinco microgramas de RNA total foram usados para a síntese de DNA complementar (cDNA) com o kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). As reações de PCR em tempo real foram realizadas pelo sistema *TaqMan* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Cada reação continha o cDNA (50 ng), a sonda para *Interleucina 8* como iniciador e a sonda *GAPDH* como controlo de acordo com Benakankakere et al., 2015 ². Os dados foram analisados pelo método comparativo C_t ($\Delta\Delta C_t$). Após a normalização do nível de mRNA das amostras pelo mRNA ATT/TTC com estímulo poli I:C os grupos com os diferentes hapótipos no gene *IL8* foram comparados entre si.

- **Análise dos níveis de IL-8 por ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Foram utilizados duzentos microlitros de sobrenadante de cultura de cada condição já mencionada para análise da concentração de IL-8 por ensaio imunoenzimático ELISA utilizando um kit comercialmente disponível (BD Biosciences, CA). O procedimento foi realizado segundo instruções do fabricante, a quantidade total de proteína presente em cada poço das placas de cultura de 96 poços foi mensurada em pg/uL e as leituras foram realizadas em leitor de placas a 450 nm.

- **Análise dos resultados**

O software GraphPadPrism 6.0 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para análise estatística desse estudo. Os dados das análises de migração de neutrófilos, expressão gênica e ELISA, 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% ($p < 0.05$).

1. Antoniak S, Mackman N. Multiple roles of the coagulation protease cascade during virus infection. *Blood*. 2014; 123(17): 2605-13.
2. Benakanakere M, Abdolhosseini M, Hosur K, Finoti LS, Kinane DF. TLR2 promoter hypermethylation creates innate immune dysbiosis. *J Dent Res*. 2015; 94(1): 183-91.

3. Kusek ME, Pazos MA, Pirzai W, Hurley BP. In vitro coculture assay to assess pathogen induced neutrophil trans-epithelial migration. *J Vis Exp*. 2014; (83): e50823.
4. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet*. 2010; 11(3): 181-90.
5. Nauseef WM. Isolation of human neutrophils from venous blood. *Methods Mol Biol*. 2014; 1124: 13-8.
6. Pardo B, Gomez-Gonzalez B, Aguilera A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(6): 1039-56.
7. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. 2014; 32(4): 347-55.

ANEXOS

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

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu, (nome) _____, (nacionalidade) _____, portador do RG nº _____, residente à _____, na cidade de _____, Estado de _____, concordo voluntariamente em participar da pesquisa "INVESTIGAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE HAPLÓTIPOS NOS GENES INTERLEUCINA 4 E INTERLEUCINA 8" e declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

1. Fui esclarecido que a referida pesquisa tem por objetivo estudar se a carga genética da pessoa (que foi herdada dos pais) influencia na defesa do corpo contra a inflamação, sangramento e dor na gengiva (Doença Periodontal) e se a carga genética do paciente influencia na produção das suas proteínas importantes para o sistema imune. Para isso, passarei por uma coleta de sangue (sem nenhum risco para mim) sem precisar fazer jejum. Para realização desse procedimento não terei gasto nenhum.
2. Fui esclarecido que a realização da pesquisa não trará riscos para mim, pois: a) serão utilizados materiais descartáveis; b) me perguntaram se tenho alguma doença como: do coração, diabetes, artrite. A intenção disso é evitar algum risco para mim, como queda de pressão ou possível mal-estar como consequência da coleta de sangue; c) fui orientado a apertar levemente o esparadrapo que veda o local por pelo menos 10 minutos. Além disso, fui orientado a não fazer qualquer espécie de esforço físico com o antebraço de onde foi coletado o sangue por pelo menos 4 horas depois da coleta.
3. Fui esclarecido que, se for necessário fazer algum procedimento para melhorar minha saúde bucal, tratar meu problema de gengiva ou dos dentes, serei encaminhado pelos pesquisadores responsáveis para Clínica especializada nesse tratamento, mediante disponibilidade de vaga para determinado tratamento.
4. Fui esclarecido que meu sangue será congelado e posteriormente estudado em laboratório (mas não aparecerá o meu nome). Receberei o benefício de ser informado da minha chance natural (genética) de ter Doença Periodontal. Além disso, receberei orientação dos dentistas para uma melhor escovação dos dentes e gengiva. Receberei limpeza profissional dos dentes (profilaxia profissional) e se necessário, encaminhamento para outros tratamentos na Faculdade de Odontologia de Araraquara. Além disso, estarei contribuindo espontaneamente para a comunidade científica conhecer melhor a relação entre a chance natural de ter Doença Periodontal e a consequência para o sistema de defesa natural da pessoa (sistema imune).
5. Estou ciente que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização.
6. Estou ciente que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras, porém, será mantido a todo instante o sigilo de minha identidade, assegurando minha privacidade. Caso eu tenha interesse em saber do resultado da pesquisa, poderei entrar em contato com o pesquisador responsável (telefone abaixo) após 1 ano da data da coleta de sangue.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, _____ de _____ de 20__.

Telefone do Pesquisador
Responsável
(16) 3301-6504

Assinatura do Paciente

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 15 de dezembro de 2015

LIVIA SERTORI FINOTI