

LUIZ PAULO CARVALHO ROCHA

**AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO E TRANSCRIÇÃO DO GENE FOXP3
NA PERIODONTITE CRÔNICA**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2017**

Luiz Paulo Carvalho Rocha

AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO E TRANSCRIÇÃO DO GENE FOXP3 NA PERIODONTITE CRÔNICA

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia- área de concentração em Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Rocha Moreira

Coorientador: Prof. Dr. José Eustáquio da Costa

Belo Horizonte
2017

Ficha Catalográfica

R672a Rocha, Luiz Paulo Carvalho .
2017 Avaliação da metilação e transcrição do gene FOXP3 na
T periodontite crônica / Luiz Paulo Carvalho Rocha. -- 2017.

48 f. : il.

Orientadora: Paula Rocha Moreira.
Coorientador: José Eustáquio da Costa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

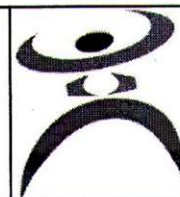
1. Periodontite crônica. 2. Metilação do DNA. 3. Epigenômica. 4. Fatores de transcrição Forkhead. 5. Periodontia. I. Moreira, Paula Rocha. II. Costa, José Eustáquio da . III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO E TRANSCRIÇÃO DO GENE FOXP3 NA PERIODONTITE CRÔNICA


LUIZ PAULO CARVALHO ROCHA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre, área de concentração Periodontia.

Aprovada em 29 de maio de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Paula Rocha Moreira - Orientador
ICB - UFMG


Prof(a). Jose Eustaquio da Costa
FO - UFMG


Prof(a). Ricardo Santiago Gomez
FO - UFMG


Prof(a). Jeane de Fátima Correia Silva Alves
Centro Universitário Newton Paiva

Belo Horizonte, 29 de maio de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Deus que, na simplicidade e relevância da vida humana, nos deu a capacidade de questionar sobre sua criação e tentar compreendê-la.

Aos meus pais Tânia e Cleber, pela dedicação diária em proporcionar a mim e a minha irmã as melhores condições para que sejam possíveis as realizações dos nossos objetivos e por todo amor e cuidado.

À minha irmã Stephanie pelo incentivo e carinho.

À minha orientadora Paula pela confiança, pelo suporte em todas as horas, pela amizade, pela dedicação e pelo exemplo.

Ao meu co-orientador José Eustáquio pelos ensinamentos, por me tornar um profissional melhor, pela confiança.

À Simone, Nayagara, Telma por contribuírem de forma essencial para a realização desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia das Interações Celulares por ajudarem de alguma forma no desenvolvimento do estudo.

Aos colegas de pós-graduação por dividirem momentos de alegrias e dificuldades ao longo do percurso do mestrado.

Aos meus amigos por sempre me incentivarem e motivarem e pelos momentos de diversão.

À Faculdade de Odontologia da UFMG, e aos pacientes, que participaram dessa pesquisa, por permitirem que esse trabalho fosse realizado.

RESUMO

FOXP3 é um fator transcricional que atua principalmente nas células T reg., modulando a resposta imune e alterando o desenvolvimento e a progressão de doenças. A periodontite crônica é uma doença inflamatória polimicrobiana que resulta em danos aos tecidos periodontais, devido à interação complexa entre os periodontopatógenos e à resposta imunoinflamatória do hospedeiro. A metilação tem grande impacto no silenciamento de genes e na consequente diminuição da síntese proteica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de metilação do FOXP3 na periodontite crônica e associá-lo a sua expressão e a parâmetros clínicos da doença periodontal. Foram coletados fragmentos de tecidos gengivais de pacientes com periodonto saudável e com periodontite crônica, sendo 30 pacientes-controle e 30 com periodontite crônica. As amostras foram submetidas à avaliação histológica, à extração de DNA e RNA, ao tratamento enzimático de identificação de metilação e ao qPCR. Na avaliação do perfil de metilação, não foi encontrada diferença estatística entre os perfis de metilação e expressão dos grupos periodontite e controle. Foi encontrada uma diferença na metilação entre os controles do gênero masculino e feminino ($p=0,002$) e na expressão entre o grupo periodontite de ambos os gêneros ($p=0,049$). No gênero masculino, a hipermetilação foi maior no grupo periodontite ($p=0,037$), a hipometilação ($p=0,037$), e a expressão do Foxp3 foi maior no grupo controle ($p=0,037$). Estudos adicionais são necessários para avaliar a relevância funcional desses achados.

Palavras-chave: Periodontite Crônica. Epigenômica. Metilação de DNA.

ABSTRACT

Evaluation of DNA methylation and transcription of FOXP3 gene in chronic periodontitis

FOXP3 is a transcriptional factor that acts mainly on T reg cells, modulating the immune response and alters the development and progression of disease. Chronic periodontitis is a polymicrobial inflammatory disease that results in damage to periodontal tissues, due to the complex interaction between periodontal pathogens and immunoinflammatory response of the host. Methylation has great impact on gene silencing and consequent reduction in protein synthesis. The aim of this study was to evaluate the FOXP3 methylation profile in chronic periodontitis and assign it to clinical parameters of periodontal disease. Fragments of gingival tissue were collected from patients with healthy periodontium (30) and patients with chronic periodontitis (30). The samples were submitted to histological evaluation, the extraction of DNA and RNA, treatment with enzymes that identify methylation and to qPCR. In assessing the methylation profile, there was no significant difference between the profiles of groups periodontitis and control. A difference in methylation was found between male and female controls ($p=0,002$) and in the expression between the periodontitis group of both genders ($p=0,049$). In the male gender, hypermethylation was higher in the periodontitis group ($p=0,037$), and Foxp3 expression was higher in the control group ($p=0,037$). Additional studies are needed to assess the functional relevance of these findings.

Keywords: Chronic Periodontitis. Epigenetics. DNA Methylation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Locus do gene Foxp3, seu promotor e as regiões conservadas DNA não codificante	20
Gráfico 1 - Perfil de metilação dos grupos controle e Periodontite Crônica. As barras cinzas representam os valores de hipermetilação e as barras brancas representam os valores de hipometilação	29
Gráfico 2 - Quantificação relativa de mRNA do FOXP3 nos grupos controle e periodontite crônica. As barras representam os valores da quantificação de mRNA do gene FOXP3 controlado pela quantificação de mRNA do gene Beta-actina	30
Gráfico 3 - Perfil de metilação nos tecidos gengivais de indivíduos-controle dos gêneros masculino e feminino. Letras iguais representam comparações com diferenças estatísticas significantes (a: $p=0,002$; b: $p=0,002$)	31
Gráfico 4 - Perfil de metilação nos tecidos gengivais de indivíduos periodontite crônica dos gêneros masculino e feminino. ($p=0,132$)	31
Gráfico 5 - Perfil de metilação nos grupos C e PC, considerando o gênero masculino. Letras iguais representam comparações com diferenças estatísticas significantes a: $p=0,037$; b: $p=0,037$	32
Gráfico 6 - Perfil de metilação nos grupos C e PC considerando o gênero feminino. ($p=0,896$)	32
Gráfico 7 - Quantificação relativa de FOXP3 nos grupos C e PC, considerando o gênero. Letras iguais representam diferenças estatísticas significantes. a: $p=0,037$; b: $p=0,049$	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos dados demográficos, parâmetros clínicos entre o grupo controle e periodontite crônica. *diferenças estatisticamente significantes.	28
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
T	Thymus
LPS	Lipopolissacarídeo
TLR	Toll-like receptor
PAMP	Padrão molecular associado a Patógeno
APC	Antigen-presenting cell
B	Bursa of Fabricius
Th	Células T helper
Treg	Células T reguladora
nTreg	natural Treg
iTreg	induced Treg
HSP60	Heat Shock Protein 60
IPEX	Immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X –linked
CNS	Conserved Noncoding Sequence
TSDR	Treg cell-specific demethylated region
STAT	Signal transducer and activator of transcription
CpG	Cytosine triphosphate deoxynucleotide
CD	Cluster of Differentiation
CTLA	Cytotoxic-T-Lymphocyte-Associated Antigen
FOXP3	Fork head Box P3
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NFKB	Nuclear factor kappa B
NIC	Nível de inserção clínica
PS	Profundidade de sondagem
SS	Sangramento à sondagem
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
TGF- β	Transforming growth factor beta
PC	Periodontite Crônica

C	Controle
qPCR	Reação em cadeia da Polimerase quantitativa
Ct	Cycle threshold

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo geral	22
3.2	Objetivos específicos.....	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	Considerações éticas	23
4.2	Grupos amostrais	23
4.3	Avaliação histológica das amostras	24
4.4	Extração do DNA e Quantificação	25
4.5	Análise do perfil de metilação.....	25
4.6	Extração de RNA e Quantificação	26
4.7	Síntese de DNA complementar – cDNA.....	26
4.8	Avaliação da transcrição gênica	27
4.9	Análises estatísticas	27
5	RESULTADOS	28
5.1	Dados clínicos, demográficos e histológicos	28
5.2	Metilação do Foxp3 nos grupos C e PC	29
5.3	Transcrição do Foxp3 nos grupos C e PC.....	29
5.4	Metilação FOXP3 em relação ao gênero.....	30
5.4.1	Metilação do FOXP3 no grupo C em relação ao gênero	30
5.4.2	Metilação do FOXP3 no grupo PC em relação ao gênero.....	31
5.4.3	Metilação do Foxp3 entre C e PC considerando cada gênero	31
5.5	Transcrição do FOXP3 em relação ao gênero	33
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39

APÊNDICES	45
ANEXOS	47

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória que atinge as estruturas de suporte e proteção dos dentes. Na doença, pode ser observada a destruição de tecidos moles, a reabsorção óssea e a perda de órgãos dentários (MOORE e MOORE, 1994). Dentre as formas clínicas principais de periodontite, destaca-se a periodontite crônica. Essa é a forma de apresentação da doença mais frequente em adultos, apresenta uma taxa de progressão baixa, e a presença de irritantes locais é compatível com a gravidade da doença (ARMITAGE, 1999).

A periodontite é considerada uma doença multifatorial. A patogenia dessa, atualmente, é compreendida como o resultado da interação entre uma microflora altamente virulenta e/ou um alto nível de susceptibilidade do hospedeiro, sendo o desequilíbrio da resposta imune determinante para o início e a evolução da doença (CARDOSO *et al.*, 2008). Essa susceptibilidade pode estar relacionada aos fatores envolvidos com a regulação gênica, como fatores transcricionais e a metilação do DNA, interferindo na predisposição ao aparecimento dos sinais e sintomas da doença.

Fatores transcricionais são proteínas que têm a função de regular a transcrição gênica e, conseqüentemente, a expressão de moléculas e proteínas. O fator transcricional Foxp3 (fork head Box P3), cujo gene está localizado no cromossomo X, é o principal responsável pela diferenciação e função das células T reguladoras (T reg). Esse subtipo de células T CD4+ é indispensável para o controle da inflamação excessiva causada pela resposta imune aos agentes patogênicos (JOSEFOWICS *et al.*, 2012; SAKAGUCHI *et al.*, 2008). A expressão do Foxp3 nas células T em humanos aumenta a transcrição de genes anti-inflamatórios específicos, como os das proteínas de membrana CD25 e CTLA-4 e da IL-10, ou diminui a transcrição de genes pró-inflamatórios, como IL-2, IL-4 e IFN- γ na resposta imunológica (MAILER, 2009). A expressão de Foxp3 se mostrou alterada entre os tecidos gengivais saudáveis e de indivíduos com periodontite crônica, com o aumento da expressão da molécula Foxp3 em tecidos doentes (CARDOSO *et al.*, 2008).

Além dos fatores transcricionais, outro mecanismo de regulação gênica é a metilação do DNA, um dos principais mecanismos epigenéticos observados nas

células humanas (SHAW, 2006). A metilação é o processo pelo qual o grupo metil é adicionado ao carbono 5' do anel de citosina. Esse grupo altera a carga da dupla fita de DNA e promove o empacotamento do DNA em torno das histonas. Além disso, a presença do grupo metil impede a interação dos fatores de transcrição no promotor do gene, inibindo efetivamente a transcrição (BAYLIN, 2005; SANDERS, 2006). A metilação de DNA provoca uma alteração molecular potencialmente reversível, com isso muitas funções celulares podem ser alteradas, como a regulação da proliferação celular e o processo inflamatório (ADCOCK *et al.*, 2007).

O mecanismo molecular que mantém estável a expressão do Foxp3 é a metilação do DNA. Em células T reguladoras, o gene do Foxp3 está desmetilado, enquanto que, em células *naive* ou “virgens” e em células T efectoras, esse gene está metilado. Com isso, os padrões de metilação do gene Foxp3 estão diretamente ligados ao perfil de resposta inflamatória do indivíduo (LIU *et al.*, 2010). Apesar do seu papel central na biologia das células T reguladoras, a base molecular da função do Foxp3 não é totalmente entendida. Estudos têm avaliado a ocorrência de metilação do gene Foxp3 no desenvolvimento de doenças com perfil inflamatório, contudo ainda não foi investigada na doença periodontal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O órgão dentário é essencial para desempenhar funções como a fala, a alimentação, o equilíbrio do sistema estomatognático, além de função estética. O mecanismo de inserção, sustentação e manutenção do dente na arcada é desempenhado pelo periodonto, que também mantém a integridade superficial da mucosa mastigatória. O periodonto é uma estrutura localizada em torno do dente e é composto pela gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar. Essas estruturas formam uma unidade biológico-funcional que age como uma barreira contra danos mecânicos e microbianos (LINDHE, 2010; CARRANZA, 2007; WILSON, 1996).

Como qualquer outra estrutura no corpo humano, o periodonto está sujeito ao desenvolvimento de doenças, conhecidas como doenças periodontais. Essas doenças são estados inflamatórios desencadeados por agentes e/ou condições sistêmicas ou locais, que afetam os tecidos de suporte e inserção dos dentes. O espectro das doenças periodontais abrange desde uma inflamação reversível na gengiva (gengivite), até uma condição inflamatória grave de todo o periodonto (periodontite) (ARMITAGE, 1999).

O diagnóstico das doenças periodontais é feito por meio de histórico médico e odontológico e mediante exame clínico através do uso de uma sonda periodontal milimetrada. No exame clínico, são obtidos os indicadores intrabucais: Profundidade de sondagem (PS), Nível de inserção clínica (NIC) e Sangramento à sondagem (SS). A PS é a distância, em milímetros, da margem gengival até o fundo da bolsa periodontal, cujo valor maior ou igual a 4 mm indica sítio afetado pela perda de inserção. O NIC é a distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte até o fundo da bolsa periodontal, cujo valor maior que 5mm indica sítio com perda grave de inserção periodontal. Esse conjunto de parâmetros e sinais ajuda o profissional a determinar o estado da condição periodontal (CARRANZA, 2007; AAP, 2015).

Existem muitas doenças que podem acometer o periodonto de inserção, como a periodontite crônica, a periodontite agressiva, a periodontite ulcerativa necrosante, a periodontite associada a doenças sistêmicas. No Brasil, estima-se que 19% da população, entre 30 a 45 anos, possuam condições periodontais graves (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). De acordo com o trabalho de Demmer e

Papapanou (2010), no qual foi realizada uma revisão de artigos epidemiológicos publicados logo após o Workshop Internacional de Critérios de Classificações de 1999, foi verificado que os pacientes do gênero masculino são os que apresentam o maior número de casos de periodontite, sendo, também, os que exibem maiores graus de gravidade e extensão da doença, o que se observa também com o avanço da idade em ambos os gêneros.

Dentre as doenças periodontais, destaca-se a periodontite crônica (PC). A PC é a forma mais comum de periodontite e afeta cerca de 30% da população mundial (NARES, 2003). Comumente diagnosticada em adultos, pode apresentar a forma localizada – menos de 30% dos sítios afetados – ou a forma generalizada – mais de 30% dos sítios afetados (ARMITAGE, 1999). Pode estar associada ou ser modificada por doenças sistêmicas, como diabetes mellitus, infecção por HIV; além de ser modificada por outros fatores, como o tabagismo e o estresse emocional. Clinicamente, observa-se inflamação gengival, perda de inserção e formação de bolsas periodontais acima de 4mm. A destruição detectada é compatível com a presença de fatores locais, como acúmulo de placa e cálculo. É uma doença de progressão lenta, com grandes períodos de quiescência e curtos períodos de atividade (LINDHE, 2010).

A extensão de dentes acometidos e a taxa de progressão da doença podem ser variáveis entre os indivíduos. A natureza progressiva da doença pode ser confirmada por exames clínicos periódicos. Não existem indícios clínicos que possam prever o desenvolvimento da PC nos indivíduos susceptíveis, mas está bem estabelecido que toda PC tem como fator etiológico primário o biofilme periodontopatogênico e sempre é precedida de uma gengivite (AAP, 2015).

O tratamento da PC se baseia na remoção do biofilme bacteriano da superfície dentária, e com isso há redução dos estímulos inflamatórios destrutivos e consequente controle da doença (LINDHE, 2010). Embora as bactérias periodontopatogênicas representem o fator etiológico mais importante para o início da PC, sua progressão é multifatorial. Fatores externos, como higiene oral, tabagismo, alcoolismo, poluição, estresse, e fatores intrínsecos ao hospedeiro, como a condição de saúde sistêmica do paciente, idade, gênero e a composição genética e epigenética do hospedeiro, podem influenciar no curso da doença (MOREIRA *et al.*, 2009).

A cavidade bucal é um local de grande colonização de micro-organismos. Embora, aproximadamente, 750 espécies diferentes de micro-organismos possam colonizar a superfície bucal, apenas uma parte delas pode estar envolvida com a PC (HAFFAJEE e SOCRANSKY, 1994; WILSON, 1996; KAZOR *et al.*, 2003). Tão importante quanto à presença da placa bacteriana é a sua composição e a complexidade, pois a placa deve promover uma quebra nos mecanismos de defesa do hospedeiro e causar a doença. Os micro-organismos periodontopatogênicos possuem alto grau de virulência, com capacidade de colonizar as superfícies dentárias subgengivais, produzir substâncias lesivas, como proteases e endotoxinas (lipopolissacarídeos-LPS), orquestrar os mecanismos imunes destrutivos e ser resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro (NISHIHARA e TAKEYOSHI, 2004). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Eikenella corrodens* e *Treponema denticola* são representantes dessas espécies mais virulentas estudadas na doença periodontal (ALABANDAR, 2002).

A evolução da doença decorre do desequilíbrio entre os estímulos periodontopatogênicos e a resposta imunoinflamatória do hospedeiro. O processo de desencadeamento da PC se inicia quando as bactérias conseguem invadir a camada epitelial do tecido gengival através da interação com a integrina β -1, proteína de adesão presente na membrana celular do hospedeiro, e penetrar a barreira celular. Esse processo é essencial para a sobrevivência e a replicação das bactérias, que evitam parte do sistema de controle do hospedeiro (YILMAZ *et al.*, 2002). LPS, peptídeoglicanos, lipoproteínas de membrana, padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), DNA bacteriano e RNAs de fita dupla são reconhecidos pelos receptores tipo Toll (TLRs) das células epiteliais e também das outras células residentes do periodonto (fibroblastos, osteoblastos, células dendríticas) e causam instabilidade no sistema de defesa do hospedeiro (HANS e HANS, 2011).

A ativação dos TLRs das células residentes estimula a produção de citocinas e quimiocinas, como a IL-8, que vão desencadear uma reação da resposta imune inata, o que provoca a migração, primeiramente de neutrófilos e posteriormente de macrófagos/monócitos e também linfócitos (BENEDETTO *et al.*, 2013).

Esse processo inflamatório inicial localizado, gerado na resposta inata, dura aproximadamente 21 dias e, com a permanência do biofilme bacteriano, o infiltrado inflamatório se intensifica, e os sinais prodrômicos da doença são notáveis (COCHRAN, 2008; BENEDETTO *et al.*, 2013). Com a lesão instalada, o processo inflamatório adquire um caráter imune adaptativo. Esses processos promovem a proliferação e a migração apical do epitélio juncional, o que provoca a formação de “bolsas”. Nesse estágio da doença, o infiltrado inflamatório é em sua maioria linfocitário, e o perfil de resposta dessas células define, em grande parte, o curso da doença (PAGE e SCHRODER, 1976; KORNMAN, 1997; PARACHURU *et al.*, 2014).

Na resposta imune adaptativa ocorre a apresentação de antígenos bacterianos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), por exemplo as células dendríticas, para os linfócitos B e T. A ativação de linfócitos B provoca a diferenciação dessas células em plasmócitos, que produzem anticorpos contra os antígenos bacterianos. Já a ativação de linfócitos T pode provocar a diferenciação desse tipo celular em Thelper1 (Th1) e Thelper2 (Th2). Os linfócitos B representam a maior porcentagem (50%) do número de linfócitos em tecidos gengivais com inflamação intensa, ao passo que os linfócitos T representam a maior porcentagem (60%) do infiltrado em tecidos com inflamação menos intensa, podendo apresentar os subtipos celulares Th1, Th2, Th17 e Treg (PARACHURU *et al.*, 2014; KOPITAR *et al.*, 2006).

Os linfócitos T possuem papel crucial na evolução da PC. Os linfócitos Th1 possuem um perfil de resposta mais celular e produzem, principalmente, IFN- γ , citocina ativadora de macrófago, que são estimulados a fagocitar micro-organismos, além de expressar o receptor ativador do NF-kB (RANKL), a chave para a diferenciação dos osteoclastos (NAGASAWA *et al.*, 2007). Os linfócitos Th2 possuem um perfil de resposta mais humoral, com a produção de citocinas que promovem a eliminação e proteção contra patógenos e a estimulação de células B a produzirem imunoglobulina, por exemplo (ABBAS *et al.*, 2012).

Já os linfócitos Th17 são produtores da IL-17, citocina que estimula células endoteliais, epiteliais e fibroblastos a produzirem as moléculas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e prostaglandina E2, e estimula os osteoblastos a produzirem RANKL. A IL-17 possui papel importante na manutenção das barreiras de proteção nas mucosas do hospedeiro contra certas bactérias e fungos extracelulares, como *Klebsiella pneumoniae* e *Candida Albicans* (CHEN *et al.*, 2011, PUEL *et al.*, 2011).

Estímulos de IL-6, -21, -1, -23 e TGF- β são necessários para a diferenciação das células Th17, mas sem o estímulo da IL-6, o TGF- β inibe a Th17 e estimula sua diferenciação em Treg (CHENG *et al.*, 2014).

Existem, ainda, linfócitos T autorreativos que reconhecem componentes próprios, como o colágeno tipo I e a proteína HSP60 (heat shock protein-60) (KOTAKE *et al.*, 1999; PARACHURU *et al.*, 2014; YAMAZAKI *et al.*, 2002; NAKAJIMA *et al.*, 2005). A proteína HSP60 é uma molécula encontrada no patógeno mais comum na PC, a *P.gingivalis*, e tem a capacidade de estimular uma resposta imunoinflamatória, quando apresentada aos linfócitos pelas APCs. Quando isso ocorre, as células imunes começam a reconhecer o epítipo HSP60, proteína constituinte homóloga tanto para a bactéria quanto para o hospedeiro, como um padrão molecular a ser combatido. O mimetismo entre antígenos bacterianos e antígenos próprios é uma das explicações para a destruição tecidual causada pelo próprio hospedeiro (HERNANDEZ *et al.*, 2011). Estima-se que cerca de 80% da destruição observada clinicamente seja resultado da ação do sistema imune do indivíduo.

A evolução e progressão da doença podem estar relacionadas à regulação da atividade dessas células T. A regulação da resposta imune na doença periodontal não está completamente elucidada. Existe um subconjunto de linfócitos T CD4+ cuja função é suprimir a resposta imunológica e manter a autotolerância. Essas células, chamadas de células T reguladoras, ou Treg, têm a capacidade de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, atividade e proliferação celular. Estima-se que cerca de 1-5% do infiltrado linfocitário, na lesão periodontal, seja composto por células Treg (CARDOSO *et al.*, 2008).

As Treg expressam altos níveis da molécula CD25 (receptor de citocina IL-2, cuja função é estimular a sobrevivência celular) e da CTLA-4 (molécula que inibe a ativação de células T), além de produzir o TGF- β (inibidor de proliferação e função efetora de células T e ativação de macrófagos) e o IL-10 (inibidor de macrófagos ativados e de células dendríticas) (COLLISON *et al.*, 2007; ABBAS *et al.*, 2012).

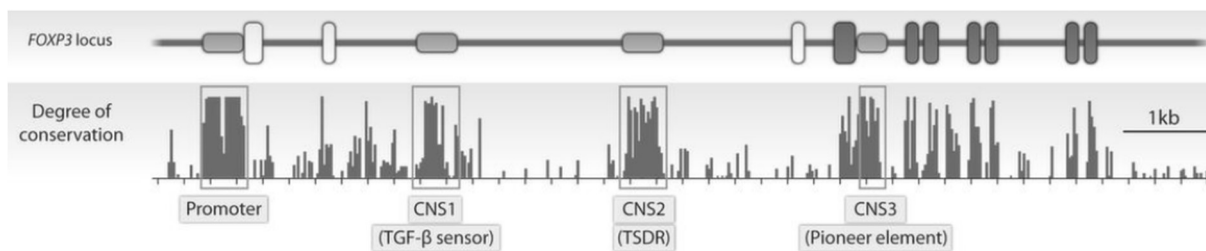
Essas células apresentam alta expressão do gene Foxp3, que possui papel principal na função e caracterização das células T reguladoras. O Foxp3 é um fator de transcrição cuja função é suprimir genes relacionados a processos inflamatórios e estimular a expressão de genes associados às funções das Tregs. A

regulação feita pelo Foxp3 ocorre através da interação com uma gama de proteínas nucleares e outros fatores de transcrição, por exemplo, o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e o fator nuclear K β (NF-k β). A interação com o NFAT suprime a ativação de genes das citocinas pró-inflamatórias IL-2, IL-4 e IFN- γ , além de estimular a expressão de CD25 e CTLA-4. O FOXP3 também interage com o NF-k β , reprimindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12 e IL-15 (ABBAS *et al.*; 2012; XIAO *et al.*, 2010; LOIZOU *et al.*, 2011).

O gene Foxp3 está localizado no cromossomo X, mais especificamente no braço curto na posição p11.23-13.3, e faz parte de uma subfamília de fatores de transcrição (FOXP1, FOXP2, FOXP3 e FOXP4). O FOXP3 somente é expresso nas Tregs e tem a função de manter a tolerância imune periférica através da supressão de células T reativas e de regular outras respostas imunoinflamatórias (SAKAGUCHI, 2008). Desordens na expressão do FOXP3, que causam defeitos nas Treg, são a causa de complicações linfoproliferativas fatais e agressivas, como desregulações imunes, IPEX (síndrome ligada ao X) e poliendocrinopatias (KIM *et al.*, 2014; WILDIN *et al.*, 2001).

A expressão do Foxp3 depende da atividade transcricional do seu promotor gênico, que, por sua vez, depende da interação de fatores epigenéticos nas regiões de sequências conservadas de DNA não codificante (CNS) como visto na Figura 1. No locus do Foxp3, são encontradas três CNS altamente conservadas (CNS1, CNS2, CNS3), sendo que a sua expressão é dependente do estado de metilação dessas regiões. Por exemplo, a metilação da CNS2, ou região desmetilada específica da Treg (TSDR), é fundamental para o funcionamento desse tipo celular, uma vez que essa região está totalmente metilada em células T convencionais e desmetilada em Treg (TAO *et al.*, 2016; TOKER e HUEHN, 2011).

Figura 1 Lócus do gene *Foxp3*, seu promotor e as regiões conservadas de DNA não codificante.



Fonte: Token e Huehn, 2011

Existem dois tipos de células T CD4+ Foxp3+ (Treg): as células Treg naturais (nTreg), que são produzidas no timo, e as células Treg induzidas (iTreg), células T CD4+ virgens periféricas estimuladas pela exposição ao TGF-β. iTreg são comumente geradas, em resposta à estimulação antigênica, em mucosas, durante inflamações crônicas ou em tolerância após transplante (BAUTISTA *et al.*, 2009). Células nTreg são mais estáveis que células iTreg, e essa condição pode estar relacionada a mudanças epigenéticas na expressão do Foxp3 (LAL *et al.*, 2009). A expressão do Foxp3 pode ser alterada por diferentes estímulos extra e intracelular, como sinalização da IL-2 com participação do fator de transcrição STAT5, ou a sinalização pelo TGF-β (LAL e BROMBERG, 2009).

A susceptibilidade do indivíduo à PC pode estar relacionada à regulação da atividade de genes de caráter imunoinflamatórios. A epigenética lida com a regulação gênica é responsável pelas alterações dinâmicas que ocorrem na forma que o genoma é processado nas células (GOPISETTY *et al.*, 2006). Inflamações crônicas e diferentes agentes infecciosos são alguns dos fatores que podem modificar o estado do epigenoma. As presenças constantes de inflamação e de bactérias na doença periodontal suportam a hipótese de alteração do epigenoma na doença. A investigação de mecanismos epigenéticos em genes importantes da resposta imune nos indivíduos com doença periodontal pode ser esclarecedora sobre a patogênese da doença (JOHNSON e BELSHAW, 2008).

Em nosso genoma, estão codificadas todas as informações que nos fazem ser o que somos. Mas, mais importante que a informação em si, é a maneira como isso é lido e processado em nossas células. A epigenética é a responsável por essa gestão, mudando a forma como nosso genoma é traduzido sem alterar a sequência de bases do DNA nuclear (DENNIS, 2003). A epigenética pode levar ao silenciamento ou à expressão gênica, modificando a estrutura da cromatina, o que

faz com que algumas regiões permaneçam disponíveis ou não para a transcrição (BAYARSAIHAN, 2011).

A metilação do DNA é a principal alteração epigenética encontrada em humanos, sendo caracterizada por uma reação covalente de adição de um grupo metil em uma citosina na posição 5 do dinucleotídeo CpG (XU e DU, 2010). As ilhas CpGs são regiões do genoma com maior frequência de dinucleotídeos CpG e onde estão localizados a maioria dos lócus promotores, cerca de 50-60% de todos os nossos genes possuem ilhas CpG (ILLINGWORTH e BIRD, 2009). Hipermetilação é o termo utilizado para se referir ao aumento da metilação nas ilhas CpG, o que pode inibir a transcrição gênica. Já a hipometilação é o decréscimo do conteúdo de metil ligado ao DNA, que pode possibilitar a transcrição gênica (PEREIRA, 2000). A metilação do DNA também é o fator principal na inativação do cromossomo X, que, no caso das mulheres, tem a função de compensar o cromossomo X extra (JIRTLE e SKINNER, 2007).

O fator de transcrição Foxp3 tem sua expressão intimamente ligada ao padrão de metilação do seu promotor gênico (KANAMORI *et al.*, 2016). Muitos trabalhos têm mostrado a relação do padrão de metilação do Foxp3 com alteração da atividade das Treg e o efeito em doenças com perfil inflamatório (TAO *et al.*, 2016; CAMPOS *et al.*, 2015; WIERDA *et al.*, 2010). Contudo, o padrão de metilação do FOXP3 ainda não foi investigado na PC. Uma vez que as células Treg (naturais ou induzidas) possuem função fundamental na regulação dos processos inflamatórios, que pode ser essencial para minimizar os efeitos destrutivos da inflamação no periodonto (CARDOSO *et al.*, 2008), o estudo do perfil de metilação do FOXP3 nos tecidos gengivais de indivíduos com PC pode esclarecer os mecanismos envolvidos na transcrição desse gene na doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de metilação no gene do fator transcricional Foxp3 e sua transcrição gênica em fragmentos de tecido gengival de indivíduos com periodontite crônica.

3.2 Objetivos específicos

a) avaliar a ocorrência de metilação no gene do fator transcricional Foxp3 em fragmentos de tecido gengival de indivíduos com periodontite crônica e de indivíduos sem a doença.

b) avaliar a transcrição de FOXP3 em fragmentos de tecido gengival de indivíduos com periodontite crônica e de indivíduos sem a doença.

c) correlacionar o perfil de metilação de FOXP3 com os níveis de transcrição gênica nos fragmentos de tecido gengival de indivíduos com periodontite crônica e de indivíduos sem a doença.

d) avaliar associações da ocorrência de metilação e dos níveis de transcrição do gene FOXP3 com os parâmetros de gravidade da periodontite crônica.

e) avaliar possíveis diferenças do perfil de metilação e transcrição do Foxp3 entre os gêneros de ambos os grupos, controle e periodontite crônica.

4 METODOLOGIA

4.1 Considerações éticas

Este projeto faz parte de um mais amplo denominado “Avaliação de alterações epigenéticas na periodontite crônica”, que foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da UFMG (parecer nº01311912.9.0000.5149) e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, conforme resoluções CNS n 196/96 e 304/00, do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, recebendo o parecer número ETIC-075/11 COEP/UFMG e o número 428.667 COEP/SMSPBH.

Todos os participantes foram informados sobre o estudo, incluindo a metodologia e os objetivos, e foram incluídos apenas aqueles que aceitaram participar da pesquisa. Indivíduos atendidos nas clínicas da Faculdade de Odontologia da UFMG (FO-UFMG) e no Centro de Especialidade Odontológica de Venda Nova (CEO-Venda Nova) foram incluídos nesta investigação. Todos os pacientes submetidos à triagem receberam o tratamento odontológico indicado, independentemente de sua participação na pesquisa. Foi obtido de cada indivíduo o consentimento livre e esclarecido (Anexo A e B) para a participação no projeto, além do preenchimento de uma ficha clínica (Apêndice B) e um periodontograma (Apêndice C). Um questionário foi aplicado a todos os indivíduos para obter informações sobre os fatores de risco para a doença periodontal. Com exceção da doença periodontal, os indivíduos incluídos no estudo eram sistemicamente saudáveis.

4.2 Grupos amostrais

O grupo de estudo foi composto por 30 indivíduos sem evidência clínica da doença periodontal (grupo controle C) e por 30 indivíduos com PC (grupo PC). Todos os pacientes foram submetidos à anamnese e ao exame clínico. Um único examinador, previamente calibrado (κ 0,85 para profundidade de sondagem e

0,88 para o nível de inserção clínica), realizou todos os exames periodontais, e foram verificados os parâmetros de profundidade de sondagem (PS), o nível de inserção clínica (NIC) e o sangramento à sondagem (SS). Para os parâmetros PS e NIC, a sondagem foi realizada em seis sítios por dente e anotados os maiores valores nas superfícies vestibular, lingual/palatina, mesial e distal. Os dados referentes ao SS foram registrados na superfície de todos os dentes no momento da realização da PS ou até 30 segundos de forma dicotômica (+) e (-). O exame clínico foi realizado obedecendo às normas de biossegurança, com o auxílio de um espelho clínico e uma sonda periodontal milimetrada (modelo da Universidade da Carolina do Norte Hu-friedy®).

O diagnóstico da PC foi baseado nos critérios de Armitage (1999) e Lopez *et al.* (2002). Os indivíduos com PC incluídos no estudo apresentavam sangramento à sondagem, quatro ou mais dentes com um ou mais sítios com $PS \geq 4$ mm e $NIC \geq 3$ mm (LOPEZ *et al.*, 2002). Fragmentos gengivais foram coletados durante cirurgia para a raspagem a retalho, executada durante o tratamento proposto para cada indivíduo. Todos do grupo PC apresentavam periodontite crônica avançada generalizada. No grupo controle, foram coletados fragmentos em sítios com ausência de sangramento à sondagem, PS menor ou igual a 3mm, e NIC menor ou igual a 3mm. O material desse grupo foi coletado de áreas adjacentes a dentes indicados para exodontia, ou na região contralateral de sítios com indicação de aumento de coroa clínica. As amostras de tecidos coletadas foram divididas em duas porções, uma foi armazenada em 1mL de solução conservadora de ácidos nucléicos (RNAholder, BioAgency, Brasil), e a outra em Tissue-tek (Sakura, Torrance, CA, USA), ambas estocadas a -80°C até o processamento das amostras.

Os critérios de exclusão aplicados foram: uso de antibiótico ou de anti-inflamatório nos últimos seis meses; uso de medicações que apresentam associação com crescimento gengival; gestantes ou lactantes; condições sistêmicas alteradas, como diabetes, hepatite; pacientes imunocomprometidos; elementos dentários com pericoronarite; indivíduos com menos de 15 dentes; e histórico de tabagismo.

4.3 Avaliação histológica das amostras

Cada amostra coletada foi submetida a secções de 10 micrometros no criostato, a -35C, para a confecção de lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina e para caracterização da amostra e confirmação de restrito infiltrado inflamatório em amostras do grupo controle. Nessa etapa, foi realizada a contagem de células inflamatórias em cada fragmento coletado no aumento de 400x.

4.4 Extração do DNA e Quantificação

Parte do fragmento gengival armazenado em Tissue-Tek foi incubada com proteinase K, a 55°C, até a sua completa digestão. Após esse procedimento, o DNA foi submetido à extração pelo kit DNeasy Blood & Tissue Kit (250) (Cat. No. 69506/ QIAGEN Sciences, Maryland 20874, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Denovix. Foram considerados DNA puros aqueles que apresentaram leitura de relação DNA/proteína (260/280) acima de 1,8 e relação (260/230) acima de 1,7.

4.5 Análise do perfil de metilação

A metilação do DNA foi avaliada pelo Epiect Methyl II DNA Restriction Kit (12) (Cat. No. 335452/ QIAGEN Sciences) e analisada por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) no equipamento CFX96 (Biorad), seguindo as instruções do fabricante.

O DNA foi tratado com duas enzimas específicas, A e B, que identificam e digerem o DNA metilado e não metilado, respectivamente. O tratamento foi realizado a 56°C por 75 minutos. Cada amostra de DNA foi dividida em 4 tubos, denominados Mo (sem enzimas), Ms (enzima A), Md (enzima B), Msd (enzima A + B). Ao final do processo, o tubo Mo apresentou o DNA sem modificações; o tubo Ms, as frações metiladas do DNA; o tubo, Md as frações não metiladas; e o tubo Msd, pouca ou nenhuma fração do DNA. Os produtos dessa etapa foram submetidos à qPCR com o primer do gene Foxp3 (EPHS115010-1ª Human FOXP3, PPP1R3F - Cat. No. 20160229029/QIAGEN Sciences), que flanqueia a região promotora de interesse. Os valores de metilação foram quantificados em software específico, fornecido pelo fabricante (AS Biosciences, Qiagen, Chatsworth, CA).

4.6 Extração de RNA e Quantificação

O tecido gengival armazenado em RNAholder (BioAgency Biotecnologia, Brasil) foi cortado, macerado e homogeneizado com Tissue Grinder (Kondes, Vineland, NJ, USA) em um tubo do tipo eppendorf, contendo 1mL de Trizol; posteriormente, foi centrifugado a 12000g/10 min a 4°C. A extração do RNA obedeceu às recomendações do fabricante (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA).

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf de 1,5mL e adicionaram-se 200µl de clorofórmio (Merck, Inc., Whitehousestation, NJ, USA), agitado em vórtex, durante 15 segundos, e incubado, por 3 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 12000g/10 min a 4°C. Após a centrifugação, foram observadas 3 fases na solução: fase vermelha de fenol-clorofórmio, interfase, contendo o DNA e proteínas, e a fase transparente, contendo o RNA.

A fase transparente foi transferida para outro tubo contendo 500µl de álcool isopropílico (Merck, Inc., Whitehousestation, NJ, USA) e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 12000g/10 min a 4°C, e o sobrenadante, desprezado. O precipitado de RNA foi lavado com 1mL de álcool etílico 75% gelado (Merck, Inc., Whitehousestation, NJ, USA) e centrifugado a 7500g/5min a 4°C, descartando novamente o sobrenadante. O *pellet* de RNA foi seco à temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. Em seguida, foi diluído em 15 µl de água livre de nuclease DEPC, quantificado no Denovix e armazenado a -80°C. Foram consideradas puras as amostras que apresentaram uma relação RNA/proteína (260/280) maior que 2,0.

4.7 Síntese de DNA complementar – cDNA

Após a extração de RNA, as amostras foram submetidas ao tratamento com Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA), segundo o protocolo do fabricante. Para o experimento, 1µg de RNA foi diluído em volume final de 8µL, contendo 1µL de tampão e 1µL da enzima DNase. Após 15 minutos de incubação, à temperatura ambiente, foi adicionado 1µL

de EDTA, e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 70°C para a inativação da enzima DNase. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado após reação de transcrição reversa utilizando o kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA), seguindo protocolo proposto pelo fabricante.

4.8 Avaliação da transcrição gênica

As amostras de cDNA foram submetidas à leitura pela técnica de qPCR, no equipamento CFX96 (Biorad). As reações foram feitas com o sistema de quantificação fluorescente TaqMan_Gene expression assay (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) para o gene Foxp3 (Hs01085834_m1 FOXP3; Lot: 1195263; Validade: 03/2018; 1195272 G1, AppliedBiosystemsby Life Technologies, USA). Como controle endógeno, foi utilizado Beta-actina (Human ACTB (20x), Ref: 4333762T, Lot: 1506158 (applied biosystems by Life Technologies, UK).

A expressão relativa do gene alvo foi calculada e normalizada com o endógeno Beta-actina. Os resultados foram avaliados relativos à transcrição do gene alvo, normalizado com o endógeno e relativo a uma amostra calibradora. A amostra calibradora foi formada por um *pool* de amostras de sangue de indivíduos saudáveis. Todas as reações foram realizadas em duplicatas. A transcrição gênica foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (AppliedBiosystemsUserBulletin No. 2) como previamente descrito (Livak e Schmittgen, 2001). O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ é uma equação matemática, na qual as mudanças na expressão gênica são calculadas baseadas nas diferenças entre as calibradoras e as experimentais, normalizadas por uma amostra de referência. O valor inferido para ΔCt equivale às diferenças entre o valor da média dos Cts do gene de interesse (alvo) e da média dos Cts do gene normalizador (endógeno). O cálculo da fórmula $\Delta\Delta Ct$ envolve a subtração entre o valor de ΔCt para cada amostra experimental e o valor do ΔCt para as amostras calibradoras.

4.9 Análises estatísticas

Foram realizadas análises estatísticas com os dados obtidos utilizando o programa estatístico SPSS (StatisticalPackage for the Social Sciences, Chicago,

USA), versão 21.0. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar a distribuição dos valores das variáveis. O teste Kruskal-wallis foi utilizado para investigar a diferença entre os grupos, seguido do teste U de Man-Whitney. O valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5- RESULTADOS

5.1 Dados clínicos, demográficos e histológicos

Os dados clínicos, demográficos e histológicos dos indivíduos foram obtidos e analisados referentes a cada grupo em relação à presença ou à ausência da PC. A média de idade dos indivíduos incluídos neste estudo não foi estatisticamente diferente entre os grupos. Tanto o grupo controle quanto o grupo periodontite foram compostos por 50% do gênero masculino e do feminino. Os indivíduos doentes apresentaram parâmetros clínicos de PS e NIC maiores que os indivíduos-controle. Os dados demográficos e as características clínicas dos indivíduos incluídos no estudo estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 Comparação dos dados demográficos, parâmetros clínicos entre o grupo controle e periodontite crônica. *diferenças estatisticamente significantes.

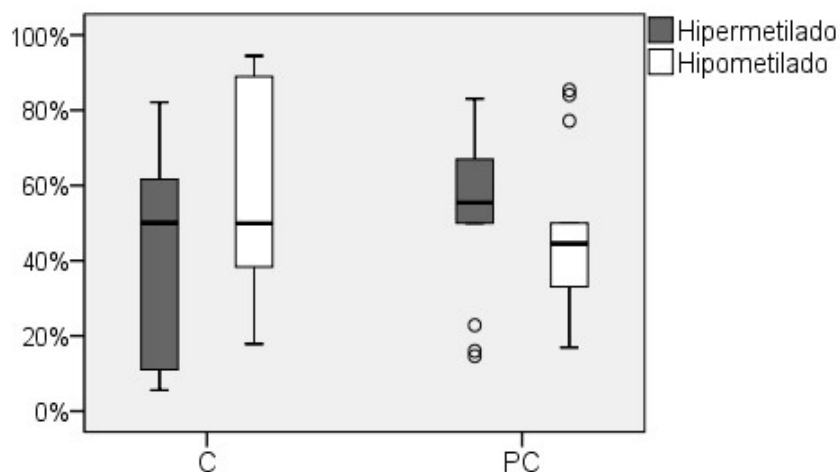
	Controle (n=30)	Periodontite Crônica (n=30)	p*
Idade (anos) média±DP	37,96±8,29	38,48±8,72	0,904
Gênero Masculino (n)	15(50%)	15(50%)	-
Gênero Feminino (n)	15(50%)	15(50%)	-
Profundidade de Sondagem (mm) média±DP	1,8±0,76	7,7±2,21	0,000*
Nível de inserção clínica (mm) média±DP	1,9±0,80	9,0±2,88	0,000*
Perda de osso alveolar	Não	Sim	-

O infiltrado inflamatório observado foi misto e com predomínio de células mononucleares em todos os grupos avaliados neste trabalho. O grupo PC apresentou a mediana do número de células inflamatórias por campo de 252,5, variando de 79 a 409. No grupo controle, a mediana foi de 50,5, variando de 20 a 98 células inflamatórias por campo. A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p=0,0001$).

5.2 Metilação do Foxp3 nos grupos C e PC

As taxas da hipermetilação (DNA metilado) e da hipometilação (DNA não metilado) observadas nos grupos C e PC estão representadas no **Gráfico 1**.

Gráfico 1 Perfil de metilação dos grupos controle e Periodontite Crônica. As barras cinzas representam os valores de hipermetilação e as barras brancas representam os valores de hipometilação.



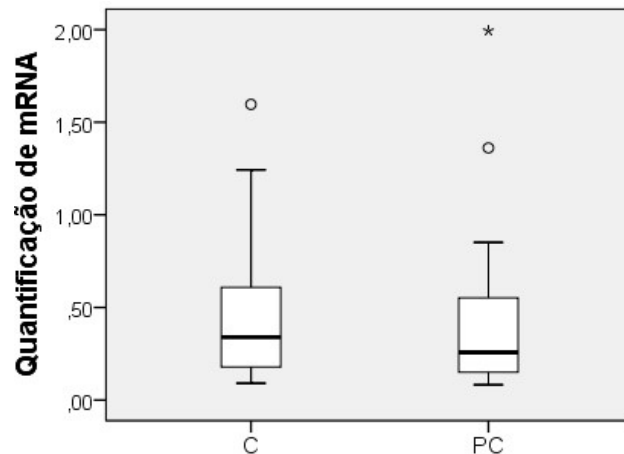
As taxas de hipometilação foram comparadas entre os grupos C e PC, assim como as taxas de hipermetilação. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos avaliados ($p=0,295$). Também não houve correlações entre as taxas de metilação e os parâmetros clínicos no grupo C (PS, $p=0,964$; NIC, $p=0,697$), nem no grupo PC (PS, $p=0,616$; NIC, $p=0,704$).

5.3 Transcrição do Foxp3 nos grupos C e PC.

A metilação é um processo biológico que tem a função de impedir a transcrição gênica quando o gene em questão está metilado. Com o objetivo de

avaliar se as taxas de metilação encontradas nos grupos controle e periodontite crônica estão influenciando a transcrição do gene *Foxp3*, foi comparada a quantificação relativa de RNA mensageiro (mRNA) produzida por cada grupo, como mostra o **gráfico 2**.

Gráfico 2 Quantificação relativa de mRNA do FOXP3 nos grupos controle e periodontite crônica. As barras representam os valores da quantificação de mRNA do gene FOXP3 controlado pela quantificação de mRNA do gene Beta-actina



Não houve diferenças na quantificação relativa de mRNA entre os grupos C e PC ($p= 0,387$). Também não foi encontrada correlação entre a produção de mRNA com as taxas de metilação, C ($p=0,292$) e PC ($p=0,776$), nem com os parâmetros clínicos, C (PS, $p=0,115$; NIC, $p=0,184$) e PC (PS, $p=0,234$; NIC, $p=0,310$).

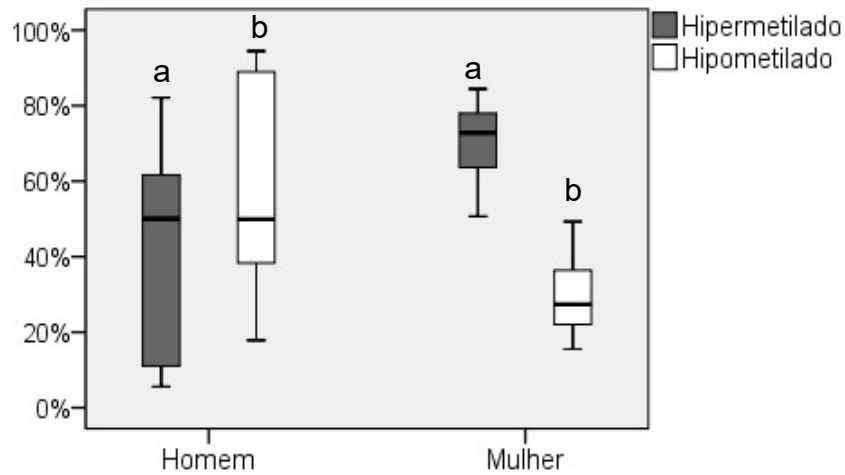
5.4 Metilação FOXP3 em relação ao gênero.

O gene do fator de transcrição *Foxp3* está localizado no cromossomo X. As mulheres possuem dois cromossomos X, um deles inativo em grande parte pela metilação, e o homem possui apenas um. Com intuito de verificar uma possível interferência do gene X inativo nas taxas de metilação nas mulheres, foram realizadas análises considerando o gênero.

5.4.1 Metilação do FOXP3 no grupo C em relação ao gênero

No grupo C, amostras provenientes de indivíduos do gênero masculino apresentaram maiores porcentagens de hipometilação, enquanto maiores porcentagens de hipermetilação foram observadas no gênero feminino (**gráfico 3**).

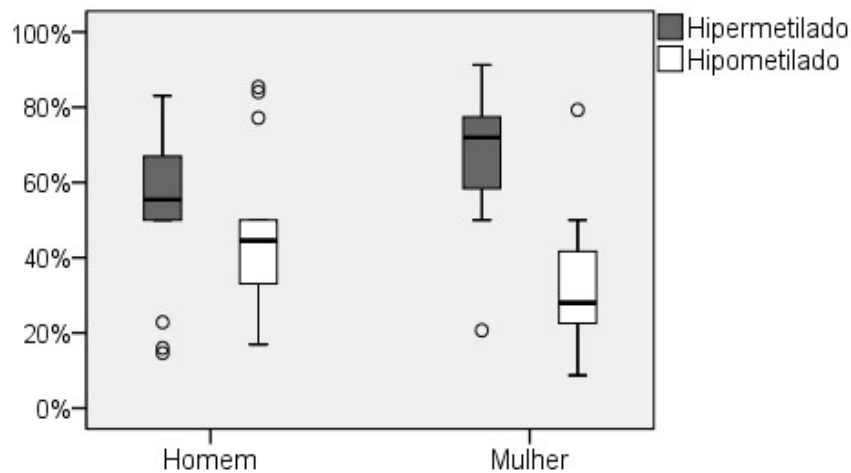
Gráfico 3 Perfil de metilação nos tecidos gengivais de indivíduos-controle dos gêneros masculino e feminino. Letras iguais representam comparações com diferenças estatísticas significantes (a: $p=0,002$; b: $p=0,002$).



5.4.2 Metilação do FOXP3 no grupo PC em relação ao gênero.

Não foi encontrada diferença estatística entre o gênero masculino e feminino nos indivíduos com PC, **Gráfico 4**.

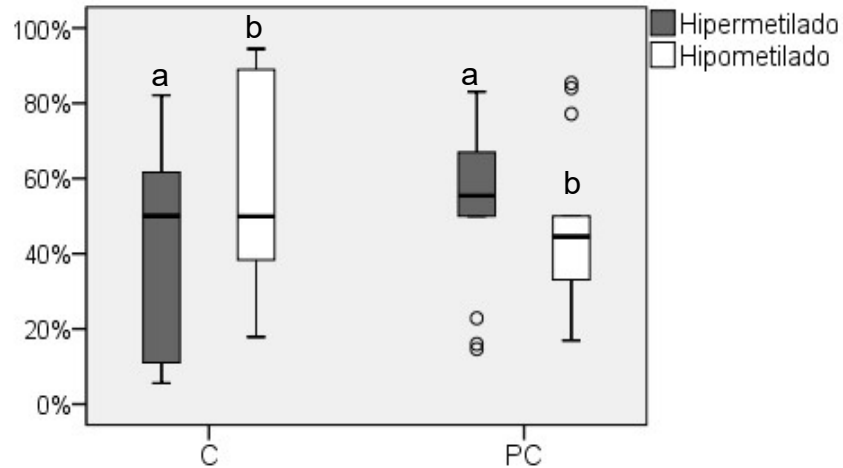
Gráfico 4 Perfil de metilação nos tecidos gengivais de indivíduos periodontite crônica dos gêneros masculino e feminino. ($p=0,132$)



5.4.3 Metilação do Foxp3 entre C e PC considerando cada gênero.

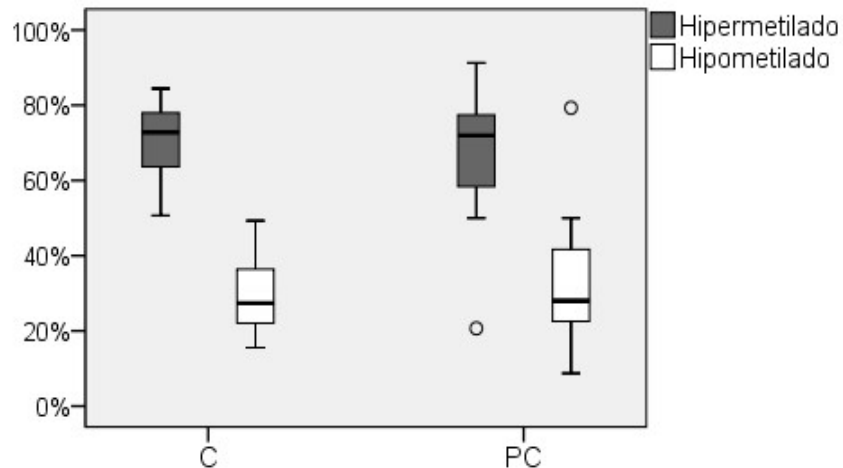
No gênero masculino, foram verificadas maiores porcentagens de hipermetilação no grupo PC comparado ao grupo C, ao passo que maiores níveis de hipometilação foram detectados no grupo C (**Gráfico 5**).

Gráfico 5 Perfil de metilação nos grupos C e PC, considerando o gênero masculino. Letras iguais representam comparações com diferenças estatísticas significantes a: $p=0,037$; b: $p=0,037$.



No gênero feminino, não foram observadas diferenças nos perfis de metilação entre C e PC (gráfico 6).

Gráfico 6 Perfil de metilação nos grupos C e PC considerando o gênero feminino. ($p=0,896$)

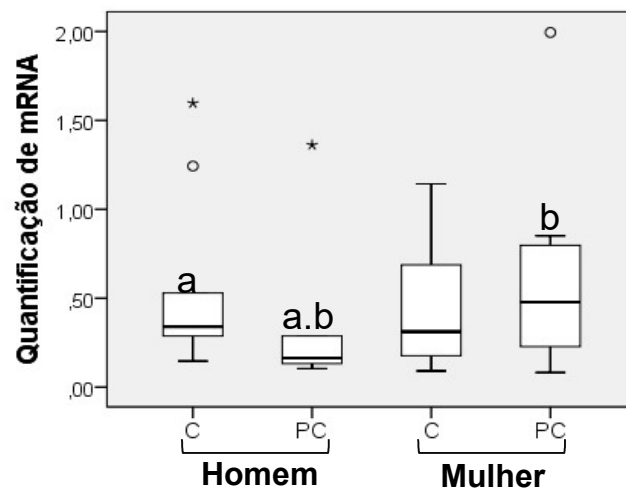


Não foram observadas correlações entre as taxas de metilação e os parâmetros clínicos nos grupos C Homem (PS, $p=0,542$; NIC, $p=0,557$), PC Homem (PS, $p=0,341$; NIC, $p=0,234$), C Mulher (PS, $p=0,143$; NIC, $p=0,222$) e PC Mulher (PS, $p=0,469$; NIC, $p=0,238$).

5.5 Transcrição do FOXP3 em relação ao gênero

Assim como foi realizado em relação aos perfis de metilação, a transcrição foi analisada considerando o gênero (**GRÁFICO 7**). Em relação aos indivíduos do gênero masculino, observou-se maior transcrição de FOXP3 no grupo C, comparado ao grupo PC ($p=0,037$). No grupo PC, indivíduos do gênero masculino apresentaram menor transcrição de FOXP3, comparado ao gênero feminino ($p=0,049$).

Gráfico 7 Quantificação relativa de FOXP3 nos grupos C e PC, considerando o gênero. Letras iguais representam diferenças estatísticas significantes. a: $p=0,037$; b: $p=0,049$.



Não foram encontradas correlações entre a transcrição do Foxp3 e as taxas de metilação nos grupos C Homem ($p=0,090$), PC Homem ($p=0,580$), C Mulher ($p=0,960$) e PC Mulher ($p=0,446$). Também não foram observadas correlações entre a transcrição e os parâmetros clínicos nos grupos C Homem (PS, $p=0,249$; NIC, $p=0,970$), PC Homem (PS, $p=0,601$; NIC, $p=0,661$), C Mulher (PS, $p=0,188$, NIC, $p=0,097$) e PC Mulher (PS, $p=0,713$; NIC, $p=0,408$).

6 DISCUSSÃO

A perda dental é uma questão grave na saúde bucal, e o impacto disso na vida das pessoas afetadas é um problema de saúde pública. Essa perda pode causar dificuldades na alimentação e na fala; alteração na estética; e uma contribuição para uma redução na qualidade de vida (BARTATO e PERES, 2003). A periodontite crônica é uma condição inflamatória grave do periodonto, que provoca a destruição dos tecidos de suporte, o que pode culminar na perda do órgão dentário, além de danificar a barreira de proteção periodontal. Essa destruição é detectável clinicamente pela formação de bolsas periodontais, perda de inserção, inflamação gengival, e radiograficamente pela visualização do nível ósseo alveolar (CARRAZA, 2007).

A permanência do biofilme bacteriano na superfície dentária intensifica a migração celular, e o infiltrado inflamatório aumenta, sendo este composto, principalmente, por macrófagos e linfócitos (PAGE E SCHROEDER, 1990). A contagem do número de células inflamatórias foi realizada neste trabalho com o objetivo de certificar que as amostras do grupo-controle apresentavam um escasso infiltrado inflamatório. O número de células inflamatórias no grupo PC foi significativamente maior que o grupo C. Foi constatado o predomínio de células mononucleares nos infiltrados inflamatório dos dois grupos. Os dados encontrados estão de acordo com os trabalhos realizados anteriormente, que mostram uma diferença no número total de células inflamatórias nos tecidos gengivais de indivíduos com ausência e presença de periodontite, sendo verificado um aumento dessas células na periodontite e um predomínio de células inflamatórias mononucleares (BATISTA *et al.*, 2002; AMORMINO *et al.*, 2013).

Os padrões de metilação de DNA estão relacionados ao silenciamento gênico. Quanto mais grupo metil ligado ao DNA, mais difícil é a interação da maquinaria transcricional com as fitas de DNA (BAYLIN, 2005). Durante a inflamação, ocorre a produção de moléculas reativas derivadas do oxigênio e do nitrogênio, que geram estresse oxidativo nas células, capaz de alterar o padrão de metilação do DNA nas regiões CpG (PARDO *et al.*, 2011). No presente trabalho, não houve diferença nos perfis de metilação entre os grupos PC e C, de forma que um perfil específico de metilação de Foxp3 não pudesse ser associado à periodontite

crônica. Não existem relatos na literatura de outros estudos que tenham abordado a investigação do perfil de metilação de *Foxp3* na doença periodontal. Também não foram encontradas diferenças nos níveis de transcrição do gene entre os grupos controle e periodontite crônica. Esse dado está em discordância com os dados obtidos por Cardoso *et al.* (2008), que encontrou níveis de mRNA do gene *Foxp3* estatisticamente maiores em indivíduos com PC. Alguns pontos podem ter influenciado nessa diferença observada em relação ao presente trabalho. No trabalho de Cardoso *et al.* (2008), o tabagismo não foi um fator de exclusão para a seleção amostral e não houve um pareamento de idade entre C e PC. Nesse estudo, o grupo PC apresentava uma maior quantidade de tabagistas em comparação ao C. Idade e tabagismo têm sido considerados preditores positivos dos níveis de células Treg, e expressão de FOXP3, no sangue periférico (HAMPRASS *et al.*, 2012). Além disso, amostras do grupo PC de Cardoso *et al.* (2008) apresentavam parâmetros clínicos de profundidade de sondagem homogêneo, e não foi descrita a distribuição de gênero do grupo amostral do estudo.

Hall *et al.* (2014) avaliaram diferenças no perfil de metilação do cromossomo X entre os gêneros e mostraram que indivíduos do gênero feminino possuem um perfil hipermetilado comparado aos indivíduos do gênero masculino. Como o gene FOXP3 está localizado no cromossomo X, a metilação do cromossomo X inativo nas mulheres poderia estar interferindo na porcentagem de metilação observada e “mascarando” a metilação do cromossomo ativo. Dessa forma, as análises ocorreram de forma separada entre os gêneros. Como o esperado, os indivíduos pertencentes à mesma condição periodontal, mas de gêneros diferentes, demonstraram perfis de metilação diferentes. Nessa análise, no grupo C, os homens apresentaram um perfil hipometilado, enquanto as mulheres um perfil hipermetilado. Não foi encontrada diferença na PC, o que pode demonstrar a interferência da inflamação presente nos tecidos gengivais desse grupo nos padrões de metilação.

Em relação à análise da transcrição entre os gêneros, foi encontrada apenas diferença estatística entre os indivíduos do grupo PC. O grupo do gênero feminino apresentou maiores níveis de transcritos comparado ao gênero masculino. Berletch *et al.* (2011) verificaram que genes do cromossomo X podem escapar da regulação epigenética, dentre elas a metilação, e serem expressos. Esse fenômeno ocorre principalmente nos cromossomos X inativos nas mulheres, mas também

podem ocorrer no cromossomo X dos homens. É estimado que em torno de 15% dos genes do cromossomo X possam escapar da inativação, sendo esse escape mais comum nos genes localizados no braço curto do cromossomo, como o gene *Foxp3*. Isso poderia explicar em parte a ausência de diferença observada no grupo C e a maior transcrição nas mulheres com PC. Além disso, é importante ressaltar que a transcrição de *FOXP3* pode ser influenciada por vários outros fatores além da metilação da região promotora do gene; como por exemplo, a presença de metilação nas regiões CNS e polimorfismos gênicos.

Com o intuito de excluir a influência da metilação do cromossomo X inativo das mulheres, análises considerando apenas indivíduos do gênero masculino foram realizadas. Um perfil hipometilado foi observado no grupo C, e um perfil hipermetilado no grupo PC. Os resultados da transcrição nesses grupos foram condizentes com os perfis observados. O grupo C mostrou maiores níveis de transcritos comparados ao grupo PC, embora uma correlação entre transcrição e metilação não tenha sido verificada. Não foi encontrada nenhuma correlação com os parâmetros clínicos da PC. A metilação gênica nas células T, principalmente no locus *FOXP3*, pode levar a um perfil pró-inflamatório dessas células com o estímulo da produção de IL-2, IL-4 e IFN- γ (LU *et al.*, 2005; SCHMIDL *et al.*, 2009). Em nosso trabalho, as taxas mais elevadas de DNA hipermetilado observadas no grupo PC podem favorecer a expressão de mediadores pró-inflamatórios com consequente instalação do processo inflamatório e desenvolvimento da doença. Esse fato sugere que o perfil hipermetilado e a menor transcrição de *FOXP3* em homens com PC são condições relacionadas ao processo patogênico da PC, e não à gravidade da doença. Estudos longitudinais são necessários para uma melhor compreensão da influência dos perfis observados no presente estudo na progressão da PC.

Na interpretação dos resultados, deve ser considerado que a amostra de tecido gengival, tanto de indivíduos controle como de PC, apresenta uma grande variedade de tipos celulares, como células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos. Como a expressão do *FOXP3* é específica do subtipo celular Treg e essa população é pequena no tecido, mesmo em estados inflamatórios, os dados de metilação e transcrição poderiam não ser correspondentes dos mesmos tipos celulares. Nesse caso, a transcrição observada seria originada apenas das Treg e a metilação, de todas as células do tecido.

O FOXP3 é a chave para o funcionamento das Tregs, principais populações de células imunossupressoras responsáveis por controlar a resposta inflamatória e autoimune (VIGNALI *et al.*, 2008). A função desse fator de transcrição está relacionada à expressão e à supressão de várias moléculas, seja diretamente ou indiretamente, através da interação com outros fatores de transcrição. Sua atividade faz com que células T CD4+ adquiram um fenótipo regulatório, o que pode auxiliar em um prognóstico melhor em inflamações destrutivas, como na PC. A metilação genética do fator de transcrição FOXP3 possui importante impacto na progressão do processo inflamatório por diminuir ou paralisar a expressão do FOXP3 em células T CD4+. Uma vez que os mecanismos epigenéticos são reversíveis, perspectivas de intervenções que permitam alterar perfis de metilação associados a doenças são desafiadoras.

O presente estudo sugere pela primeira vez que a hipermetilação do gene FOXP3 e os baixos níveis de transcritos estão relacionados ao estabelecimento da PC em homens. Estudos adicionais são necessários para determinar a relevância funcional dos perfis observados na doença periodontal e para compreender os mecanismos epigenéticos envolvidos na patogênese da doença.

7 CONCLUSÃO

a) uma diferença nas taxas de metilação foi observada entre os gêneros no grupo controle;

b) um perfil hipermetilado do gene *Foxp3* e a baixa transcrição gênica estão associados à PC em homens;

c) Ausência de associação entre metilação e transcrição do *Foxp3* com a gravidade da doença;

d) Estudos adicionais são necessários para determinar a relevância funcional das associações observadas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, H. A.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ADCOCK, I. A.; TSAPROUNI, L.; BHAVSAR, P.; ITO, K. Epigenetic regulation of airway inflammation. **Curr Opin Immunol** 19, 694-700, 2007.
- ALBANDAR, J. M. Global risk factor and risk indicators for periodontal disease. **Periodontology** 2000.v.29, p. 177-206, 2002.
- ALBANDAR, J. M.; TINOCO, E. M. B. Global epidemiology of periodontal disease in children and young persons. **Periodontol** 2000, v.29, p.153-176, apr. 2002.
- AMORMINO, S. A. F.; ARÃO, T. C.; SARAIVA, A. M.; GOMEZ, R. S.; DUTRA, W. O.; DA COSTA, J. E.; DE FÁTIMA CORREIA SILVA, J.; MOREIRA, P. R. Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. **Hum Immunol**. v. 74, n.9, p.1231-6, 2013.
- ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal disease and conditional. **Ann Periodontol**, v.4, n.1, p.16, 1999.
- BARBATO, P. R.; PERES, M. A. Tooth loss and associated factors in adolescents: a Brazilian population-based oral health survey. **Rev. Saúde Pública**. v. 43, n.1, p. 13-25, 2009.
- BATISTA, A. C.; SILVA, T. A.; CHUN, J. H.; LARA, V. S. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. **Oral Dis**. v. 8, n.5, p. 254-60, 2002.
- BAUTISTA, J. L.; LIO, C. W.; LATHROP, S. K.; FORBUSH, K.; LIANG, Y.; LUO, J.; RUDENSKY, A. Y.; HSIEH, C. S. Intracellular competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus. **Nat Immunol**. v. 10, n. 6, p. 610-7, 2009.
- BAYARSAIHAN, D. Epigenetic mechanisms in inflammation. **J Dent Res**. v. 90, n. 1, p. 9-17, 2011.
- BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol**. 2 (Suppl 1): S4-11, 2005.
- BENEDETTO, A. D. I.; GIGANT, I.; COLUCCI, S.; GRANO, M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clinical & Developmental Immunology*, 2013.
- BERLETCH, J. B.; DISTECHE, C. M. Genes that escape from X inactivation NIH Public Access, 130(2), 237-245, 2012
- CAMPOS, K.; FRANCISCONI, C. F.; OKEHIE, V.; DE SOUZA, L. C.; TROMBONE, A. P. F.; LETRA, A.; SILVA, R. M. FOXP3 DNA Methylation Levels as a Potential

Biomarker in the Development of Periapical Lesions. **Journal of Endodontics**, 41(2), 212–218, 2015

CARDOSO, C. R.; GARLET, G. P.; MOREIRA, A. P.; JÚNIOR, W. M.; ROSSI, M. A.; SILVA, J.S. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. **J Leukoc Biol.** v.84, n.1, p. 311-8, 2008.

CARRANZA, F. A.; NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; KLOKKEVOLD, P. R. *Periodontia clínica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

CHEN, R. J.; CHANG, L. W.; LIN, P.; WANG, Y. J. Epigenetic effects and molecular mechanisms of tumorigenesis induced by cigarette smoke: an overview. **J Oncol.** v. 2011, n. 2011, 2011.

CHENG, W. C.; HUGHES, F. J.; TAAMS, L. S. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(6), 541–549, 2014.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*, 79(8 Suppl), 1569–1576, 2008.

COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J.; KUO, T. T.; BOYD, K.; WANG, Y.; VIGNALI K. M.; CROSS, R.; SEHY, D.; BLUMBERG, R.S.; VIGNALI, D. A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. **Nature.** v. 450, n 7169, p. 566-9, 2007.

Consensus Report: Chronic Periodontitis. 1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4:38.

DEMME, R. T.; PAPAPANOU, P. N. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53(1), 28–44, 2010.

DENNIS, C. Genomics: compare and contrast. **Nature.** v. 426, n. 6968, p. 750-1, 2003.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000;5:78-111, 1994.

HALL, E.; VOLKOV, P.; DAYEH, T.; ESGUERRA, J. L. S; SALÖ, S.; ELIASSON, L.; RÖNN, T.; BACOS, K.; LING, C. Sex differences in the genome-wide DNA methylation pattern and impact on gene expression, microRNA levels and insulin secretion in human pancreatic islets. **Genome Biology.** v. 15, n. 12, p. 522, 2014.

HAMPRAS SS, NESLINE M, WALLACE PK, ODUNSI K, FURLANI N, DAVIS W, MOYSICH KB. Predictors of immunosuppressive regulatory T lymphocytes in healthy women. *J Cancer Epidemiol* 191090, Aug 26, 2012.

HANS, M.; HANS, V. M. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *Journal of Oral Science*, 53(3), 263–271, 2011

HERNÁNDEZ, M.; DUTZAN, N.; GARCÍA-SESNIH, J.; ABUSLEME, L.; DEZEREGA, A. SILVA N.; GAMONAL, J. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *Journal of Dental Research*, 90(10), 1164–1170, 2011.

HILLEMACHER, T.; FRIELING, H.; MOSKAU, S.; MUSCHLER, M. A.; SEMMLER, A.; KORNUBER, J.; KLOCKGETHER, T.; BLEICH, S.; LINNEBANK, M. Global dna methylation is influenced by smoking behaviour. *EurNeuropsychopharmacol.* v. 18, n. 4, p. 295-8, 2008.

ILLINGWORTH, R. S; BIRD, A. P. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* v. 583, n. 11, p. 1713-20, 2009.

JIRTLE, R.L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *NatVer Genet.* v. 8, n.4, p. 253-62,2007.

JOHNSON, I. T.; BELSHAW, N. J: Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. *Food ChemToxicol.* v.46, p. 1346-1359, 2008.

JOSEFOWICZ, S. Z.; LU, L. F.; RUDENSKY, A. Y.; & Regulatory, T. Cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 531–564, 2012.

KANAMORI, M.; NAKATSUKASA, H.; OKADA, M.; LU, Q.; & YOSHIMURA, A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends in Immunology*, 37(11), 2016

KIM, M.; JEONG, E.; KWON, E.; JOO, J.; CHOI, J. The differentiation of Porphyromonasgingivalis heat shock protein peptide- specific regulatory T cells, 235–241, 2014.

KISHI, M.; NAKAMURA, M.; NISHIMINE, M. *et a.* Genetic and epigenetic alteration profiles for multiple genes in salivary gland carcinomas. *Oral Oncology*41: 161-169, 2005.

KOPITAR, A. N.; NIH; COMMENSAL, I. A. Commensal oral bacteria antigens prime human dendritic cells to induce Th1, Th2 or T reg differentiation, (8), 1–5, 2006.

KORNMAN, K. S. Incomplete penetrance, white space--black space, disease perspective: infectious disease vs. molecular medicine. **10th Meeting of the International Conference on Periodontal Research.** September 17, 1995.J Periodontal Res. v. 32, p. 206-8, 1997.

KOTAKE, S. *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* v. 103, n.9, p. 1345-52, 1999.

LAL, G.; BROMBERG, J. S. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood.* v. 114, n. 18, p. 3727-35, 2009.

LAL, G.; ZHANG, N.; VAN DER TOUW, W.; DING, Y.; JU, W.; BOTTINGER, E. P.; REID, S. P.; LEVY, D. E.; BROMBERG, J. S. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. **J Immunol.** v. 182, n. 1, p. 259-73, 2009.

LEY, K. The second touch hypothesis: T cell activation, homing and polarization. **F1000 Research.** v. 37, n.3, 2014.

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. Tratado de periodontia clínica e implante oral. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LIU, J.; LLUIS, A.; ILLI, S.; LAYLAND, L.; OLEK, S.; VON MUTIUS, E.; SCHAUB, B. T regulatory cells in cord blood – FOXP3 demethylation as reliable quantitative marker. **PLoS One.** 2010.

LOIZOU, L.; ANDERSEN, K. G.; BETZ, A. G. Foxp3 interacts with c-Rel to mediate NF- κ B repression. **PLoS One.** v. 6, n. 4, 2011.

MAILER, R. K.; FALK, K.; ROTZSCHKE, O. Absence of leucine zipper in the natural FOXP3 Δ 2 Δ 7 isoform does not affect dimerization but abrogates suppressive capacity. **PLoS One.** 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Projeto SB Brasil 2010: pesquisa nacional de saúde bucal. **Brasília: Ministério da Saúde,** 92 p., 2011.

MOORE, W. E. C.; MOORE, L. V. H. The bacteria of periodontal disease. **Periodontology 2000,** 5: 66-77, 1994.

MOREIRA, P. R. *et al.* TNFA and IL10 gene polymorphisms are not associated with periodontitis in Brazilians. **Open Dent J.** v.7, n.3, p. 184-90, 2009.

NAGASAWA, T.; KIJI, M.; YASHIRO, R.; HORMDEE, D.; HE, L.; KUNZE, M.; SUDA, T.; KOSHY GEENA; KOBAYASHI, H.; ODA, S.; NITTA, H.; ISHIKAWA, I. Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. **Periodontology 2000.** v. 43, p. 65-84, 2007.

NAKAJIMA, T.; UEKI-MARUYAMA, K.; ODA, T. *et al.* Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. **J Dent Res.** v. 84, p. 639-643, 2005.

NARES, S. The genetic relationship to periodontal disease. **Periodontology 2000.** v. 32, n.1, 36-49, 2003.

PAGE, R. C.; SCHRODER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Lab Invest.** v. 34, n. 3, p. 235-49, 1976.

PARACHURU, V. P.; COATES, D. E.; MILNE, T. J.; HUSSAINI, H. M.; RICH, A. M.; SEYMOUR, G. J. Forkhead box P3-positive regulatory T-cells and interleukin 17-positive T-helper 17 cells in chronic inflammatory periodontal disease. **J Periodontal Res.** v. 49, n.6, p. 817-26, 2014.

PARDO CE, DARST RP, NABILSI NH, DELMAS AL, KLABDE MP. Simultaneous single-molecule mapping of protein-DNA interactions and DNA methylation by MAPit. *Curr Protoc Mol Biol*. Jul, 2011

PHILIBERT, R. A.; SEARS, R. A.; POWERS, L. S.; NASH, E.; BAIR, T.; GERKE, A. K.; HASSAN, I.; THOMAS, C. P.; GROSS, T. J.; MONICK, M. M. Coordinated DNA methylation and gene expression changes in smoker alveolar macrophages: specific effects on VEGF receptor 1 expression. **JLeukoc Biol**. v. 92, n. 3, p.621-31, 2012.

PHILSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, v. 366, p.1809–1820, 2005.

PUEL, A.; CYPOWYJ, S.; BUSTAMANTE, J.; WRIGHT, J. F.; LIU, L.; LIM, H. K.; MIGAUD, M.; ISRAEL, L.; CHRABIEH, M.; AUDRY, M.; GUMBLETON, M.; TOULON, A.; BODEMER, C.; EL-BAGHDADI, J.; WHITTERS, M.; PARADIS, T.; BROOKS, J.; COLLINS, M.; WOLFMAN, N. M.; AL-MUHSEN, S.; GALIC-CHIO, M.; ABEL, L.; PICARD, C.; CASANOVA, J. L. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 332,65–68, 2011.

SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; & ONO, M. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**.v.133, p.775–787, 2008.

SANDERS, V. M. Epigenetic regulation of Th1 and Th2 cell development. **BrainBehav Immun**. v. 20, p. 317-324, 2006.

SCHMIDL, C.; KLUG, M.; BOELD, T. J.; ANDREESSEN, R.; HOFFMANN, P.; EDINGER, M.; REHLI, M. Lineage-specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity. **Genome Res**. v. 19, n. 7, p. 1165-74, 2009.

SHAW, R. The epigenetics of oral cancer. **Int J Oral Maxillofac Surg**.v.35, p.101-108, 2006.

TAO, J. H.; CHENG, M.; TANG, J. P.; LIU, Q.; PAN, F.; LI, X. P. Foxp3, Regulatory T Cell, and Autoimmune Diseases. *Inflammation*, 3(1), 328–339, 2016.

TOKER, A.; HUEHN, J. To be or not to be a Treg cell: lineage decisions controlled by epigenetic mechanisms. *Science Signaling*, 4(158), 2011.

VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nat Rev Immunol**. v. 8, n. 7, p. 523-32, 2008.

WIERDA, R. J.; GEUTSKENS, S. B.; JUKEMA, J. W.; QUAX, P. H. A.; & VAN DEN ELSEN, P. J. Epigenetics in atherosclerosis and inflammation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 14(6), 2010

WILDIN, R. S.; RAMSDELL, F.; PEAKE, J.; FARAVELLI, F.; CASANOVA, J. L.; BUIST, N.; LEVY-LAHAD, E.; MAZZELLA, M.; GOULET, O.; PERRONI, L.; BRICARELLI, F. D.; BYRNE, G.; MCEUEN, M.; PROLL, S.; APPLEBY, M.; BRUNKOW, M. E. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and

endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. **Nat Genet.** v. 27, n. 1, p. 18-20,2001.

WILSON, T. G.; KENNETH, S.; KORNMAN, K. S. Fundamentals of periodontitis. Quintessencs books, 1996.

XIAO, Y.; LI, B.; ZHOU, Z.; HANCOCK, W. W.; ZHANG, H.; GREENE, M. I. Histone acetyltransferase mediated regulation of FOXP3 acetylation and Treg function. **CurrOpinImmunol.** v. 22, n .5, 583-591, 2010.

XU, X. F.; DU, L. Z. Epigenetics in neonatal diseases. **Chin Med J.** v. 123, n. 20, p. 2948-54, 2010.

YAMAZAKI, K.; OHSAWA, Y.; TABETA, K.; ITO, H.; UEKI, K.; ODA, T.; YOSHIE, H.; SEYMOUR, G. J. Accumulation of human heat shock protein 60-reactive T cells in the gingival tissues of periodontitispatients. **InfectImmun.** v. 70, n. 5, p. 2492- 501, 2002.

YILMAZ S, KURU B, KURU L, NOYAN U, ARGUN D, KADIR T. Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers Surg Med.* 30(1):60-6, 2002

APÊNDICES
APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA

FICHA CLÍNICA

DADOS PESSOAIS DO PACIENTE

Nome: _____ Sexo: _____ Est.Civil: _____
 Data de Nascimento: ____/____/____ Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____
 Profissão: _____ RG: _____ CPF: _____
 Renda: () 1-2 salários () 3-5 salários () 6-10 Salários
 Endereço: _____ Tel: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____

ANAMNESE

1. Queixa principal: _____
 2. Início e evolução da doença, quando foi último tratamento: _____
 3. Está sob tratamento médico? _____
 4. Faz uso de algum medicamento? _____
 5. Fez uso de antibiótico e/ou anti-inflamatórios nos últimos 6 meses? _____
 6. Tem algum tipo de alergia? _____
 7. Apresenta as seguintes condições:
 - () Alteração de pressão arterial() Diabetes
 - () Alteração cardíaca () Doenças endócrinas
 - () Hemorragias ou doenças hematológicas() AIDS
 - () História de febre reumática() Osteoporose
 - () Doença /alteração respiratória() Uso de aparelho ortodôntico
 - () Doença /alteração gastrointestinal() Gravidez
 - () Doenças renais() Outros: _____
 8. Existe, na família, alguma das alterações sistêmicas citadas? _____
- Qual o grau de parentesco? _____

9. Hábitos

1. Fumante: () Fumou por quanto tempo: _____ Quantidade: _____ Tipo: _____
2. Ex-fumante: () Abandonou o hábito há quanto tempo? _____
3. Não Fumante()
4. Quantas vezes ao dia escova os dentes? _____

	Sim	Não
--	-----	-----
5. Usa fio dental? () ()
6. Apresenta sangramento durante a escovação?() ()
7. Apresenta mobilidade nos dentes? () ()
8. Já perdeu algum dente devido à mobilidade? () ()

Observações: _____

ANEXOS

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Paciente grupo caso)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Paciente grupo caso)

Este documento tem como finalidade propor sua participação no projeto de pesquisa que tem o seguinte título: "Avaliação de Alterações Epigenéticas na Periodontite Crônica". A Periodontite é uma doença que afeta as gengivas e o osso que sustentam os dentes, principalmente em adultos, sendo a principal causa de perda dos dentes. Acreditamos que determinados hábitos e estilos de vida alterem o material genético (alterações epigenéticas) que cada indivíduo possui e que isso seja o principal motivo que explique por que algumas pessoas são mais afetadas que outras pela Periodontite. Precisamos estudar mais sobre essa doença para que possamos entender melhor sua causa e assim melhorar o tratamento dos pacientes.

O objetivo deste estudo é identificar se essas alterações do material genético poderiam causar ou agravar a doença.

Para realização deste estudo, será necessário coletar uma parte desse tecido removido durante a cirurgia periodontal, além de coletar sangue, saliva, raspado de mucosa bucal e fluido gengival.

A coleta de raspado será feita com uma escovinha macia e esterilizada que será esfregada na região de bochechas. A coleta de fluido gengival será feita por uma pequena ponta de papel também esterilizada que será colocada próxima a sua gengiva. A coleta da saliva será realizada em tubos apropriados e descartáveis, sendo necessário que você mastigue um rolinho de algodão previamente esterilizado. E para a coleta de sangue será feita uma punção venosa, utilizando materiais totalmente descartáveis e apropriados. Essa coleta de sangue será executada na própria Faculdade de Odontologia UFMG em uma sala de coletas, sendo realizada por uma técnica em Enfermagem devidamente treinada, juntamente com a Pesquisadora responsável pelo estudo. Todos os procedimentos serão efetivados por pessoas devidamente capacitadas, o que não impede a possibilidade da ocorrência de hematomas (áreas arroxeadas) após a coleta da amostra de sangue. Este estudo não terá custos para você. E você poderá retirar o consentimento a qualquer momento da pesquisa, havendo continuidade normal do seu tratamento. O seu tratamento será realizado normalmente mesmo que haja recusa em assinar esse termo.

Esta pesquisa poderá contribuir para um melhor entendimento sobre como se desenvolve a doença Periodontite, podendo melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas, e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a utilização de parte do tecido que foi removida através cirurgia, além da saliva, sangue, raspado de mucosa e fluido gengival coletados para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização de todos dados obtidos e fotos para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: _____ Data: ___/___/_____

 Nome do paciente
 DOCUMENTADO APRESENTADO: _____

 Assinatura do paciente
 N.º: _____

Pesquisadores: **Telma Cristina Arão, Luiz Paulo Carvalho Rocha.** Telefone: (31) 34093004

Assinatura Pesquisador: _____

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Paula Rocha Moreira**

Telefone: (31) 34093004

COEP (Comissão de Ética em Pesquisa) Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II – 2º andar – Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG, Brasil. 31270-901. coep@prpq.ufmg.br telefax 31 3409-459

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Paciente-controle)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Paciente-controle)

Este documento tem como finalidade propor sua participação no projeto de pesquisa que tem o seguinte título: "Avaliação de Alterações Epigenéticas na Periodontite Crônica". A Periodontite é uma doença que afeta as gengivas e o osso que sustentam os dentes, principalmente em adultos, sendo a principal causa de perda dos dentes. Acreditamos que determinados hábitos e estilos de vida alterem o material genético (alterações epigenéticas) que cada indivíduo possui e que isso seja o principal motivo que explique por que algumas pessoas são mais afetadas que outras pela Periodontite. Precisamos estudar mais sobre essa doença para que possamos entender melhor sua causa e assim melhorar o tratamento dos pacientes.

O objetivo deste estudo é identificar se essas alterações do material genético poderiam causar ou agravar a doença.

Para realização deste estudo, será necessário coletar uma parte deste tecido removido durante a cirurgia odontológica, além da coleta de sangue, saliva, raspado de mucosa bucal e fluido gengival.

A coleta de raspado será feita com uma escovinha macia e esterilizada que será esfregada na região de bochechas. A coleta de fluido gengival será feita por uma pequena ponta de papel também esterilizada que será colocada próxima a sua gengiva. A coleta da saliva será realizada em tubos apropriados e descartáveis, sendo necessário que você mastigue um rolinho de algodão previamente esterilizado. E para a coleta de sangue será feita uma punção venosa, utilizando materiais totalmente descartáveis e apropriados. Esta coleta de sangue será executada na própria Faculdade de Odontologia UFMG em uma sala de coletas, sendo realizada por uma técnica em Enfermagem devidamente treinada, juntamente com a Pesquisadora responsável pelo estudo. Todos os procedimentos serão efetivados por pessoas devidamente capacitadas, o que não impede a possibilidade da ocorrência de hematomas (áreas arroxeadas) após a coleta da amostra de sangue. Este estudo não terá custos para você. E você poderá retirar o consentimento a qualquer momento da pesquisa, havendo continuidade normal do seu tratamento. O seu tratamento será realizado normalmente mesmo que haja recusa em assinar esse termo.

Esta pesquisa poderá contribuir para um melhor entendimento sobre como se desenvolve a Periodontite Crônica, podendo melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas, e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a utilização de parte do tecido que foi removida através cirurgia, além da saliva, sangue, raspado de mucosa e fluido gengival coletados para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização de todos dados obtidos e fotos para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: _____

Data: ___/___/_____

Nome do paciente
DOCUMENTADO APRESENTADO: _____

Assinatura do paciente
N.º: _____

Pesquisadora: **Telma Cristina Arão, Luiz Paulo Carvalho Rocha.** Telefone: (31) 34093004

Assinatura Pesquisador: _____

Orientadora: **Profª. Drª. Paula Rocha Moreira**

Telefone: (31) 34093004

COEP (Comissão de Ética em Pesquisa) Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II – 2º andar – Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG, Brasil. 31270-901. coep@prpq.ufmg.br telefax 31 3409-4592