

LUIZ PAULO CARVALHO ROCHA

**ESTUDO DA METILAÇÃO DE DNA EM GENES RELACIONADOS ÀS
VIAS DE SINALIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA
PERIODONTITE**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2021
LUIZ PAULO CARVALHO ROCHA

ESTUDO DA METILAÇÃO DE DNA EM GENES RELACIONADOS ÀS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA PERIODONTITE

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Paula Rocha Moreira

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2021

043

Rocha, Luiz Paulo Carvalho.

Estudo da metilação de DNA em genes relacionados às vias de sinalização da produção de citocinas na periodontite [manuscrito] / Luiz Paulo Carvalho Rocha. - 2021.

107 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^a. Dra. Paula Rocha Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Periodontite. 3. Epigenética. 4. Citocinas. I. Moreira, Paula Rocha. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE LUIZ PAULO CARVALHO ROCHA

243/2021 _ ENTRADA 1º/2017 _ 2017713214

Às oito horas do dia 30 de novembro de 2021, reuniu-se por meio de plataforma on-line, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "ESTUDO DA METILAÇÃO DE DNA EM GENES RELACIONADOS ÀS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA PERIODONTITE", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Paula Rocha Moreira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição
Dra. Paula Rocha Moreira	UFMG
Dr. Peterson Antônio de Oliveira Dutra	PUC Minas
Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza	PUC Minas
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG
Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau	UFMG

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 30 de novembro de 2021.**

Dr^a. Paula Rocha Moreira

Dr. Peterson Antônio de Oliveira Dutra

Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Dr^a. Erika Cristina Jorge

Dr^a. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior, em 30/11/2021, às 17:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Paula Rocha Moreira, Professora do Magistério Superior, em 30/11/2021, às 17:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Fernanda Medlechi Canepes Lobato de Almeida, Coordenador(a), em 30/11/2021, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Peterson Antônio Dutra de Oliveira, Usuário Externo, em 30/11/2021, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Paulo Eduardo Alencar de Souza, Usuário Externo, em 30/11/2021, às 21:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau, Membro de comissão, em 06/12/2021, às 11:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade desta documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orcao_arquivo_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orcao_arquivo_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orcao_arquivo_externo=0), informando o código verificador 1117853 e o código CRC 8448F34F.

Dedico essa tese a Deus, a vida e ao tempo.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais Tânia e Cleber, pela dedicação 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.

A minha irmã Stephanie pelo incentivo, amor e cuidado.

As colegas Simone, Nayagara e 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 meus amigos por sempre me incentivarem e motivarem e pelos momentos de diversão.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e à UFMG, pela infraestrutura física e acadêmica que permitiram a execução do trabalho.

Aos pacientes, que participaram dessa pesquisa, por permitirem que esse trabalho fosse realizado.

*“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”
Isaac Newton*

RESUMO

A periodontite é uma doença de caráter imunoinflamatório caracterizada pela destruição dos tecidos periodontais em resposta a um desafio periodontopatogênico. O início e progressão da doença são marcados por mudanças celulares e moleculares que levam a um padrão de resposta inflamatória destrutiva não resolutive. Esse padrão resulta nos achados clínicos como maiores profundidades de sondagem e perda de inserção clínica. Os mecanismos inflamatórios destrutivos da periodontite apresentam períodos de atividade e quiescência, e o perfil de produção de citocinas pode definir a duração dos períodos e determinar o grau de dano periodontal. Uma mudança no perfil de produção de citocinas pode ser regulada pela expressão gênica de diversas moléculas de sinalização. A expressão gênica, por sua vez, pode ser alterada por modificações epigenéticas. A metilação de DNA é uma alteração epigenética que pode diminuir a expressão, quando presente. O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a presença da metilação de DNA em genes relacionados com via de sinalização da produção de citocinas em fragmentos de tecido gengival de indivíduos com periodontite. Foram incluídos nesse estudo 60 pacientes, 30 saudáveis e 30 com periodontite, pareados por idade e sexo. Foram coletados tecidos gengivais dos locais afetados nos pacientes com periodontite e em áreas semelhantes, sem indícios de inflamação e sem alterações no periodonto, nos pacientes controle. As amostras foram submetidas a extração de DNA e RNA, e posteriormente um protocolo de identificação do padrão de perfil de metilação de DNA por meio de qPCR. Uma avaliação inicial do padrão de metilação de DNA de 22 genes foi realizada em um pool de amostras e foram observados quatro genes com diferença de metilação maior que 20% entre os grupos controle e doente. Tais genes, *MALT1*, *LTB*, *STAT5A* e *FOXP3*, foram selecionados para análises posteriores. Na etapa de validação dos dados foi visto que os genes *MALT1* e *LTB* apresentaram diferenças entre os grupos ($p = 0,05$ e $p = 0,04$, respectivamente). O gene *STAT5A* mostrou menor metilação no grupo doente comparado ao grupo controle ($p = 0,025$). O gene *FOXP3* mostrou maior porcentagem de metilação no grupo doente comparado ao grupo controle considerando os homens ($p = 0,037$), assim como menores níveis de transcritos ($p = 0,037$). Conclui-se que mudanças no perfil de metilação nos genes *MALT1*, *LTB*, *STAT5A* e *FOXP3* estão presentes nos tecidos gengivais de pacientes com periodontite. A hipermetilação e baixa transcrição do *FOXP3* pode estar relacionada patogênese da doença em homens. Além disso, a transcrição de *STAT5A* parece estar relacionada à parâmetros clínicos da doença em mulheres. Estudos adicionais sobre tais genes podem contribuir para um melhor entendimento da patogênese da doença.

Palavras-chave: Periodontite, Epigenética, Citocinas

ABSTRACT

Periodontitis is an immunoinflammatory disease characterized by the destruction of periodontal tissues in response to a periodontopathogenic challenge. The onset and progression of the disease are marked by cellular and molecular changes that lead to a pattern of non-resolving, destructive inflammatory responses. This pattern results in clinical findings such as greater probing depths and clinical attachment loss. The destructive inflammatory mechanisms of periodontitis present periods of activity and quiescence, and the cytokine production profile can define the duration of periods and determine the degree of periodontal damage. A change in the cytokine production profile can be regulated by the gene expression of several signaling molecules. Gene expression, in turn, can be altered by epigenetic modifications. DNA methylation is an epigenetic alteration that can decrease expression when present. The general objective of this work was to evaluate the presence of DNA methylation in genes related to the signaling pathway of cytokine production in gingival tissue fragments from individuals with periodontitis. This study included 60 patients, 30 healthy and 30 with periodontitis, matched for age and sex. Gingival tissues were collected from affected sites in patients with periodontitis and similar areas, without signs of inflammation and changes in the periodontium, in control patients. The samples were submitted to DNA and RNA extraction and later to a protocol for DNA methylation profile pattern identification using qPCR. We performed an initial assessment of the DNA methylation pattern of 22 genes in a pool of samples, and we observed four genes with a methylation difference more significant than 20% between the control and patient groups. Such genes, *MALT1*, *LTB*, *STAT5A*, and *FOXP3*, were selected for further analysis. We observed that the *MALT1* and *LTB* genes presented differences between the groups ($p = 0.05$ and $p = 0.04$, respectively). The *STAT5A* gene showed lower methylation in the periodontitis group compared to the control group ($p = 0.025$). The *FOXP3* gene showed a higher percentage of methylation in the periodontitis group than the control group considering men ($p = 0.037$) and lower levels of transcripts ($p = 0.037$). We concluded that changes in the methylation profile of the *MALT1*, *LTB*, *STAT5A*, and *FOXP3* genes are present in the gingival tissues of patients with periodontitis. Hypermethylation and low transcription of *FOXP3* may be related to the pathogenesis of the disease in men. Furthermore, *STAT5A* transcription appears to be related to the clinical parameters of the disease in women. Additional studies on these genes may contribute to a better understanding of the pathogenesis of the disease.

Keywords: Periodontitis, Epigenetic, Cytokine

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Tecidos periodontais de suporte e proteção.	19
Figura 2 Anatomia periodontal e parâmetros clínicos periodontais.	22
Figura 3 Patogenia da periodontite.	25
Figura 4 Citocinas, receptores e vias de sinalização.....	33
Figura 5 Lócus do gene Foxp3.....	36
Figura 6 Via JAK/STAT.	39
Figura 7 Metilação do DNA..	44
Figura 8 Perfil de metilação de DNA em genes relacionados a sinalização de produção de citocinas	54
Figura 9 Perfil de metilação dos genes selecionados..	56
Figura 10 Perfil de porcentagem de metilação de STAT5A (A) e FOXP3 (B) por sexo..	57
Figura 11 Transcrição de mRNA de genes selecionados..	57
Figura 12 Níveis de transcrição de STAT5A (A) e FOXP3 (B) considerando o sexo..	58
Figura 13 Correlação entre os níveis de transcrição de STAT5A e parâmetro clínico PS no grupo P.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Genes avaliados no painel de metilação agrupados pelas funções celulares e moleculares.....	50
Tabela 2 Ensaio usado para avaliação de metilação.....	50
Tabela 3 Ensaio usado para avaliação da transcrição gênica.....	52
Tabela 5 Dados clínicos e demográficos da população de estudo.....	53
Tabela 6 Percentuais de metilação dos genes avaliados.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

Ct *Cycle threshold*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 O periodonto.....	19
1.2 Periodontite	22
1.2.1 Microrganismos periodontopatogênicos.....	27
1.2.2 Resposta imunoinflamatória.....	29
1.2.3 Citocinas, diferenciação celular e vias de sinalização.....	31
1.3 Genes e vias que participam da sinalização celular.....	34
1.3.1 <i>FOXP3</i>	35
1.3.2 Via JAK/STAT	38
1.3.2.1 <i>STAT5A</i>	40
1.3.3 <i>MALT1</i>	41
1.3.4 <i>LTB</i>	43
1.2.4 Epigenética e periodontite.....	43
2 OBJETIVOS	47
2.1 Objetivo geral	47
2.2 Objetivos específicos.....	47
3 MÉTODOS	48
3.1 População de estudo.....	48
3.2 Extração e quantificação de DNA.....	49
3.3 Análise do painel de metilação de DNA	49
3.4 Análise com ensaios individuais de metilação de DNA	50
3.5 Extração e quantificação de RNA.....	51
3.6 Síntese de DNA complementar – cDNA.....	51
3.7 Análise da transcrição do gene	51
3.9 Análise estatística	52
4 RESULTADOS	53
4.1 Características demográficas e clínicas	53
4.2 Painel de metilação de genes relacionados com a produção de citocinas.....	53
4.3 Padrão de metilação de <i>MALT1</i> , <i>LTB</i> , <i>STAT5A</i> e <i>FOXP3</i>	55
4.4 Níveis de transcrição de <i>MALT1</i> , <i>LTB</i> , <i>STAT5A</i> e <i>FOXP3</i>	57
4.5 Correlação entre metilação e transcrição de <i>MALT1</i> , <i>LTB</i> , <i>STAT5A</i> e <i>FOXP3</i> ...58	
4.6 Correlação da metilação e da transcrição com PS.....	59
5 DISCUSSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICES.....	80

APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA.....	80
APÊNDICE B- FICHA PERIODONTAL(Periodontograma)	81
APÊNDICE C – ARTIGO SUBMETIDO REFERENTE A TESE	82
ANEXOS	107
ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Paciente grupo caso)	107
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Paciente- controle)	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 O periodonto.

O estado de saúde biológico pode ser definido pela capacidade das estruturas de um organismo de desempenharem suas funções e manterem a homeostasia. Sendo assim, se uma estrutura perde a capacidade de manter o equilíbrio fisiológico e, conseqüentemente, a capacidade de exercer sua função, todo o sistema pode ser prejudicado e o estado de saúde alterado (CHAPPLE et al., 2018).

O periodonto é um exemplo de estrutura que reúne algumas funções indispensáveis para a manutenção da saúde oral e sistêmica. Ele se localiza ao redor do dente e é composto por quatro tecidos. Eles formam uma unidade biológico-funcional que têm, principalmente, as funções de proteger e sustentar o dente na arcada (**Figura 1**) (LINDHE; LANG, 2018).

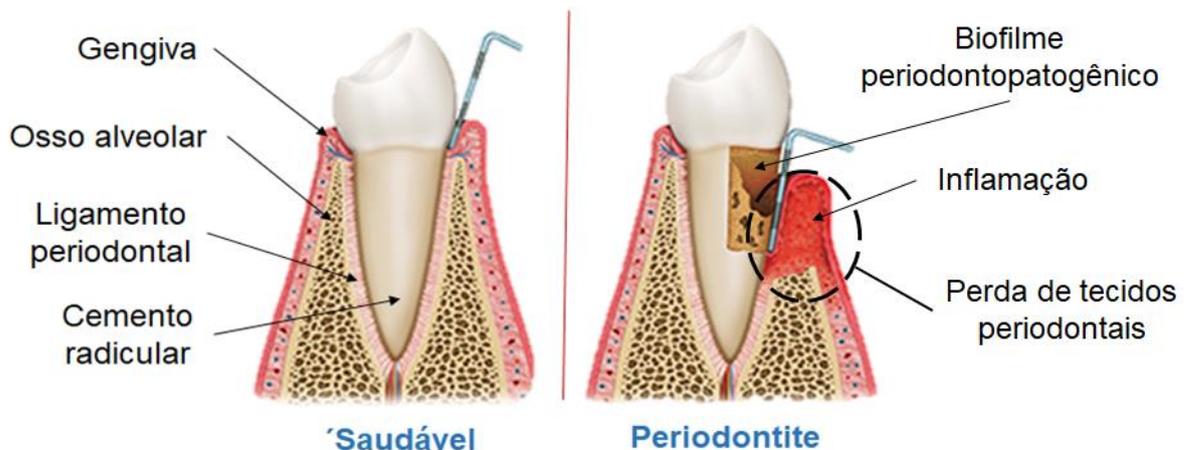


Figura 1 Tecidos periodontais de suporte e proteção. O esquema representa um órgão dentário e o tecido periodontal circundante. Fonte: Modificado de Depositphotos

Dentre esses tecidos constituintes encontramos a gengiva, mucosa que reveste a porção óssea alveolar e tem o papel de proteção contra fatores externos, mecânicos ou biológicos, e é por isso nomeada como periodonto de proteção. Já os outros três tecidos (cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar) possuem relação com a raiz do dente e têm o papel de sustentar e manter o dente na arcada dentária, chamados de periodonto de inserção (LINDHE; LANG, 2018; NEWMAN et al., 2020).

Danos ao periodonto podem comprometer a manutenção do dente na arcada e levar a problemas graves como o edentulismo. Os dentes participam do processo de mastigação, mas também são essenciais para a fonética, para a manutenção das

dimensões e do equilíbrio no sistema estomatognático, para a estabilidade oclusal e bom funcionamento da articulação temporo-mandibular, além do papel na estética e sociabilidade do indivíduo. Em virtude dessas funções, a perda de um ou mais dentes pode impactar negativamente na qualidade de vida de uma pessoa (CARRANZA et al., 2007; WHO, 2016; NEWMAN et al., 2020).

O edentulismo não é o único resultado de um periodonto gravemente comprometido. A permanência de um estado infeccioso e inflamatório no periodonto podem causar alterações na homeostasia local e sistêmica. Um periodonto danificado, ou em processo de destruição, pode ser resultado de um processo inflamatório destrutivo em resposta a uma infecção por micro-organismos patológicos. Isso se torna importante pois doenças periodontais, causadas por microrganismos, são consideradas o segundo grupo mais comum de doenças orais na população mundial (AAP, 2015).

O grupo das doenças periodontais abrange desde uma inflamação restrita ao periodonto de proteção, a gengivite, até uma inflamação grave que atinge o periodonto de sustentação, a periodontite. A gengivite é um quadro inflamatório inicial causado pelo acúmulo de placa bacteriana na superfície dentária. Ela é caracterizada clinicamente pelo sangramento gengival e é facilmente resolvida com a eliminação do fator causal, sem a perda de tecidos periodontais. Já a periodontite consiste em um acúmulo bacteriano persistente que promove uma interação mais complexa entre os periodontopatógenos, fatores ambientais e a resposta imune do hospedeiro. A confluência desses fatores pode resultar na propagação do processo inflamatório para o periodonto de sustentação. Desse modo, pode-se instalar a periodontite no indivíduo suscetível (ARMITAGE, 1999; CHAPPLE et al., 2018; JEPSEN et al., 2018; LINDHE; LANG, 2018; NEWMAN et al., 2020).

A suscetibilidade à doença periodontal descreve algumas condições especiais de um indivíduo que aumentam o risco de adquirir a doença ou agravar o estado de saúde periodontal. Essas condições especiais são descritas na literatura como fatores de risco à doença periodontal, e são considerados importantes na avaliação epidemiológica, e individual, dos pacientes acometidos. Os fatores de risco podem influenciar no início e progressão da periodontite e os mais prevalentes são o biofilme periodontopatogênico, a diabetes, a idade e o tabagismo (GENCO; SANZ, 2020).

A formação do biofilme periodontopatogênico é o fator etiológico mais importante e a disbiose promovida é preponderante para o início da doença. Esse

biofilme se forma na superfície dentária e sofre alterações ao longo do tempo em relação ao aumento da quantidade de biomassa e da composição bacteriana (BOSTANCI; BELIBASAKIS, 2012). Esse fator pode ser influenciado por condições locais como a presença de regiões retentoras de placa bacteriana e xerostomia (CHAPPLE et al., 2018).

A diabetes, a idade e o tabagismo são descritos como fatores de risco modificadores, ou moduladores, que influenciam negativamente na resposta imune inflamatória ao biofilme, resultando em uma inflamação exagerada ou uma “hiper-inflamação” (CHAPPLE et al., 2018).

A diabetes é uma alteração sistêmica que prejudica a atividade do sistema imune do hospedeiro. Deste modo, a diabetes descontrolada pode modificar a resposta celular de defesa frente ao desafio bacteriano e levar a maiores danos teciduais. Além disso, o acúmulo de produtos finais de glicosilação (AGEs) nos tecidos periodontais prejudicam os processos de reparação. Outras comorbidades sistêmicas, e imunológicas, podem prejudicar a resposta imune e levar a alteração do estado de saúde periodontal, mesmo não sendo classificadas como fatores de risco (CASANOVA; HUGHES; PRESHAW, 2014; JEPSEN et al., 2018; LALLA; PAPAPANOU, 2011).

Já a idade está relacionada as alterações fisiológicas, comportamentais e ao aparecimento de doenças, e comorbidades, durante o envelhecimento. O envelhecimento promove uma maior fragilidade do organismo pelo efeito acumulativo de patologias, frente a infecções, e está associado a periodontite (CLARK; KOTRONIA; RAMSAY, 2021). A fragilidade adquirida com o envelhecimento e a doença periodontal estão relacionados a desregulação inflamatória, o que pode explicar o desenvolvimento e maior progressão da periodontite nos indivíduos mais velhos (BAIMA et al., 2021; CLARK; KOTRONIA; RAMSAY, 2021).

Por outro lado, o tabagismo é um fator de risco comportamental e está relacionado à periodontite. Ele promove alterações sistêmicas e locais, celulares e moleculares, que prejudicam a saúde periodontal como a vasoconstrição microvascular local e a fibrose. Essas alterações impedem a manutenção do suprimento celular, da oxigenação e nutrição tecidual, e prejudica os processos de defesa e regeneração (CHAFFEE et al., 2021; JEPSEN et al., 2018).

Além disso, existem outros fatores individuais que podem influenciar na patogênese da periodontite. Esses fatores também são descritos como fatores

modificadores individuais e estão relacionados a nutrição, condição socioeconômica, estresse, etnia e sexo (G. CATON et al., 2018; JEPSEN et al., 2018).

1.2 Periodontite

Como qualquer 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. Dentre as doenças periodontais, destaca-se a periodontite pela alta prevalência na sociedade mundial e pelo grau de comprometimento das estruturas periodontais atingidas (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). Com esses indicadores conseguimos avaliar a estrutura periodontal, suas relações e a integridade dos tecidos. O sulco gengival é a região anatômica periodontal avaliada durante o exame, e as alterações encontradas podem guiar as decisões durante o tratamento (LINDHE; LANG, 2018; NEWMAN et al., 2020; PAPAPANOU et al., 2018).

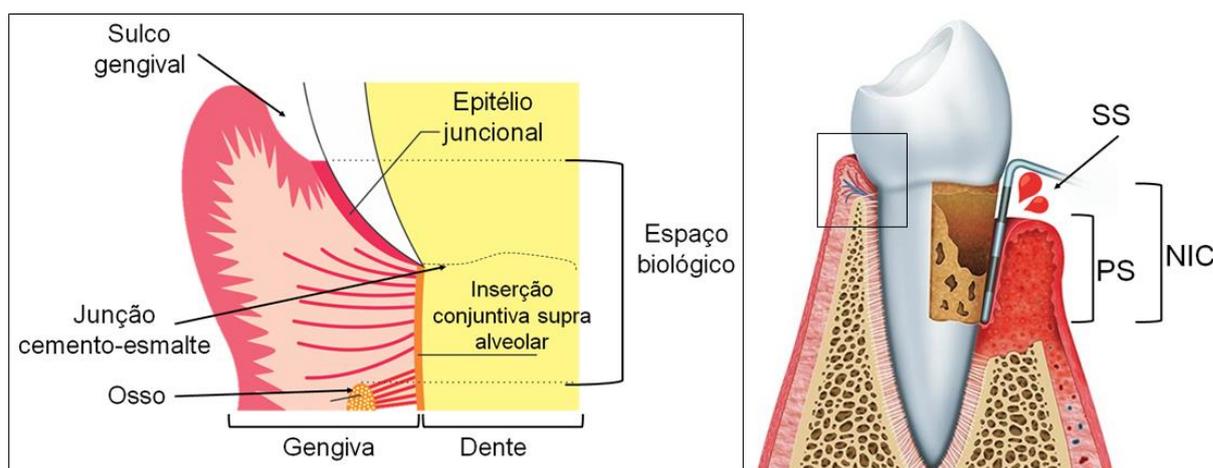


Figura 2 Anatomia periodontal e parâmetros clínicos periodontais. Esquema anatômico do periodonto e do dente. A figura A mostra os tecidos e regiões anatômicas do periodonto. A figura B evidencia os parâmetros clínicos. SS, sangramento a sondagem; PS, profundidade de sondagem; NIC, nível de inserção clínica. Fonte: Modificado de Depositphotos.br

Com a PS é possível detectar a presença da bolsa periodontal que surge devido ao aprofundamento do sulco gengival. Isso acontece pois no processo

patológico existe a migração do epitélio juncional em direção apical devido à perda dos tecidos e das fibras conjuntivas adjacentes. A PS é medida, em milímetros, da margem gengival até o fundo da bolsa periodontal, cujo valor ≥ 4 mm indica sítio afetado (LINDHE; LANG, 2018; NEWMAN et al., 2020; PAPAPANOU et al., 2018).

Com o NIC podemos mensurar a perda de tecido periodontal devido a referência anatômica da junção cimento-esmalte (JCE). Essa região representa a altura em que o osso alveolar se encontrava quando intacto. O NIC é medido, em milímetros, entre JCE até o fundo da bolsa, ou sulco periodontal, cujo valor maior que 5mm indica sítio com perda de inserção periodontal. Esse parâmetro é considerado o melhor indicador de destruição periodontal devido a precisão da aferição por meio de um ponto de referência fixo, a JCE (LINDHE; LANG, 2018; NEWMAN et al., 2020; PAPAPANOU et al., 2018).

Já o SS é a presença de sangramento no sítio verificado após a inserção da sonda no decorrer do procedimento de sondagem. É uma aferição simples e objetiva feita em todos os sítios ao redor do dente. Esse conjunto de parâmetros e sinais ajuda o profissional a determinar o estado da condição de saúde periodontal (AAP, 2018).

A saúde periodontal é caracterizada como um estado periodontal livre de doenças inflamatórias que limitam a função dessa estrutura. A manutenção da saúde periodontal também evita consequências (físicas ou mentais) para o indivíduo em decorrência de uma doença atual ou passada. O estado de saúde periodontal é definido clinicamente através da ausência de sinais de inflamação local relacionados a gengivite, periodontite, ou outra condição periodontal, mas admite-se a detecção de sangramento a sondagem. O grupo de pacientes periodontalmente saudáveis pode incluir os indivíduos com histórico de doenças periodontais que conseguiram manter a dentição e eliminar os sinais clínicos de inflamação. É importante salientar que o paciente com o periodonto saudável pode apresentar sinais de imunidade fisiológica com níveis de biomarcadores inflamatórios compatíveis com a homeostasia (CHAPPLE et al., 2018).

Durante o estado de saúde periodontal existe uma relação simbiótica entre o biofilme bacteriano na superfície dental e os tecidos do periodonto. Nesse quadro clínico existem estímulos bacterianos de baixa intensidade e o controle do hospedeiro por meio da ativação do sistema do complemento e migração de células polimorfonucleares (PMNs) (SILVA et al., 2015). É também possível observar a

ausência de fatores de risco ambientais e comportamentais nos indivíduos saudáveis (MEYLE; CHAPPLE, 2015).

Já a gengivite é caracterizada pelo maior acúmulo de placa bacteriana e sinais clínicos gengivais de inflamação como sangramento, rubor e tumefação locais. Isso ocorre devido ao aumento da resposta do hospedeiro com maior infiltrado inflamatório, composto por PMNs e células T e B, e produção de antígenos, além do aumento da vascularização local frente a uma disbiose incipiente (MEYLE; CHAPPLE, 2015). A resposta do hospedeiro ainda é proporcional aos estímulos e a condição é facilmente revertida com a remoção do fator etiológico. Também é definida clinicamente através da detecção visual do sangramento a sondagem, e não são observadas profundidades de sondagem $\geq 3\text{mm}$, em periodonto intactos, e $\geq 4\text{mm}$, em periodonto reduzidos. Em alguns casos, com a persistência do fator etiológico, biofilme se modifica e o processo inflamatório se intensifica, podendo atingir o periodonto de sustentação e adquirir caráter destrutivo em indivíduos suscetíveis. Essa condição instalada recebe o nome de periodontite (CHAPPLE et al., 2018).

A periodontite é caracterizada pela inflamação e destruição dos tecidos de suporte e proteção periodontal em resposta a estímulos periodontopatogênicos. Esse estado inflamatório destrutivo é desencadeado por uma disbiose local que provoca uma resposta inflamatória exacerbada. Nessa condição existe uma resposta desproporcional, não resolutive e crônica do hospedeiro. Quando o biofilme não é removido, se torna maior, e mais patogênico, e a liberação de fatores de virulência como antígenos, proteases e lipopolissacarídeos (LPS) se tornam mais evidentes. São produzidos anticorpos contra os periodontopatógenos e o infiltrado inflamatório se intensifica. A produção de citocinas se torna um fator crucial na modulação desse processo exacerbado e, conseqüentemente, influencia na duração e intensidade da atividade da doença (MEYLE; CHAPPLE, 2015).

Clinicamente, na periodontite pode ser observada uma inflamação gengival, perda de inserção tecidual, presença de cálculo e formação de bolsas periodontais, além de sangramento e supuração. A destruição detectada pode ou não ser compatível com a presença de fatores locais, como acúmulo de placa e cálculo. Além disso, fatores de risco ambientais, comportamentais, genéticos e epigenéticos se tornam mais evidentes e podem ser modificadores da progressão da doença. Hábitos de higiene oral, tabagismo, dieta, estresse emocional e doenças sistêmicas como diabetes mellitus, HIV, e doenças imunossupressoras são alguns desses

modificadores (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; OHLRICH; CULLINAN; SEYMOUR, 2009). Os processos descritos sobre a patogênese da periodontite a partir de uma condição de saúde clínica podem ser observados na

Figura 3.

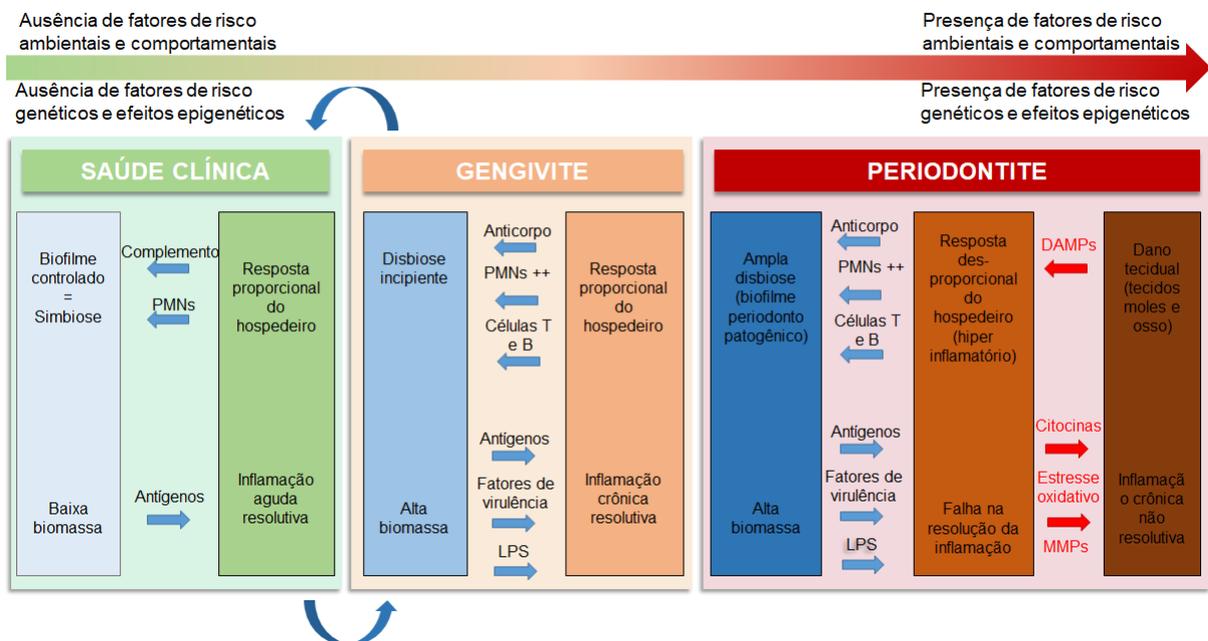


Figura 3 Patogênese da periodontite. O equilíbrio entre a resposta do hospedeiro e o estímulo bacteriano define o início e progressão da doença. Uma resposta inflamatória proporcional é causada por uma disbiose incipiente ocasionando a gengivite. Com a permanência e desenvolvimento do biofilme, uma resposta hiper-inflamatória, destrutiva e não resolútila é instalada no indivíduo susceptível. Fatores de risco comportamental, ambiental, genético e epigenético se tornam mais influentes no processo, com a evolução da doença. Fonte: Adaptado de Meyle e Chapple, 2015

A patogênese da periodontite é complexa e engloba fatores intrínsecos e extrínsecos ao indivíduo. Nos últimos anos têm-se aprimorado o conhecimento dos processos que participam dessa patogênese. Alguns conceitos foram atualizados e a noção de que um biofilme especializado e uma resposta imunoinflamatória desajustada eram fatores preponderantes para o desenvolvimento da periodontite foram considerados. Estudos recentes têm elucidado os mecanismos de ação molecular, tanto no arsenal patogênico do biofilme, quanto nas ferramentas de defesa usadas pelo hospedeiro (BENEDETTO et al., 2013; MEYLE; CHAPPLE, 2015; OHLRICH; CULLINAN; SEYMOUR, 2009)

Nesse aspecto, os fatores genéticos e epigenéticos têm sido cada vez mais estudados devido ao impacto na modulação da resposta imunológica. Em suma, o conceito atual considera que é necessário um estímulo periodontopatogênico suficiente para romper as barreiras de proteção do hospedeiro e assim o sistema de

defesa do organismo é acionado. Por algum fator de suscetibilidade, o processo inflamatório adquire um caráter destrutivo e não resolutivo, o que gera danos nos tecidos periodontais. Assim, uma inflamação crônica é instalada e o periodonto vai sendo acometido, até que exista alguma intervenção sobre o processo (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

Os avanços no conhecimento da patogênese e das características clínicas, moleculares e microbiológicas da periodontite também tiveram influência no modo de classificação das doenças periodontais. Em 1999, a Academia Americana de Periodontia (AAP) havia publicado artigos e revisões em que a entidade da periodontite era dividida em duas: periodontite crônica (PC) e agressiva. Essa divisão se baseava, dentre outros fatores, na forma clínica de manifestação dos danos periodontais, nos fatores locais encontrados, na faixa etária do paciente e no perfil inflamatório observado. A importância dos estudos das áreas básicas, que elucidam os mecanismos celulares e moleculares, nos processos de instalação e progressão da doença, acabaram por comprovar que ambas se tratavam de fenótipos diferentes de uma mesma doença. Atualmente, a periodontite é reconhecida como uma entidade patológica única, que possui estágios de destruição e perda de tecidos (I, II, III e IV), e também graus de progressão da doença (A, B e C). Tudo isso sob a influência dos fatores modificadores (PAPAPANOU et al., 2018).

Na nova classificação, os estágios são definidos de acordo com a gravidade da destruição dos tecidos periodontais e da perda dos elementos dentários, usando o NIC como o principal parâmetro clínico. De maneira simplificada, no estágio I não é observada perda de elementos dentários, o NIC aferido em torno de 1 a 2 mm e a PS \leq 4mm. No estágio II, também não é observada perda de dentes, o NIC em torno de 3 a 4 mm e a PS \leq 5mm. Já no estágio III, o NIC aferido é \geq 5 mm, existe perda dentária de até quatro elementos e a PS \geq 6 mm. No estágio IV o NIC observado também é \geq 5 mm, mas a perda dentária observada é maior que 5 dentes com necessidade de reabilitação protética e PS também \geq 6 mm (PAPAPANOU et al., 2018).

Em relação aos graus de progressão são observadas as taxas de progressão das perdas ósseas ao longo dos anos por meio do NIC. O grau A é classificado como baixa taxa de progressão com ausência de perda detectada em 5 anos. O grau B seria a taxa de progressão moderada, com perdas detectadas menores que 2 mm em 5 anos. O grau C seria a taxa de progressão rápida, com perdas detectadas maiores que 2 mm em 5 anos (PAPAPANOU et al., 2018).

A periodontite, nas formas moderadas, afeta cerca de 45% a 50% da população adulta mundial e pode apresentar características clínicas que podem diferir entre os indivíduos, mas também entre os sítios de um mesmo paciente (GENCO; SANZ, 2020; VOS et al., 2015). No Brasil, estima-se que 19% da população, entre 30 a 45 anos, possuam condições periodontais graves (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Comumente diagnosticada em adultos, a periodontite pode se apresentar de forma localizada, menos de 30% dos sítios afetados, ou de forma generalizada, mais de 30% dos sítios afetados (PAPAPANOU et al., 2018).

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

O tratamento da periodontite se baseia na remoção do biofilme bacteriano da superfície dentária, e com isso espera-se uma redução dos estímulos inflamatórios destrutivos e consequente controle da doença. Embora as bactérias periodontopatogênicas representem o fator etiológico para o início da doença, sua progressão é multifatorial (LINDHE; LANG, 2018).

1.2.1 Microrganismos periodontopatogênicos

A cavidade bucal é um local de grande colonização de microrganismos. Embora, aproximadamente, 750 espécies diferentes de micro-organismos possam colonizar a superfície bucal, apenas uma parte delas pode estar envolvida com a periodontite (HERNÁNDEZ et al., 2011; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; SOCRANSKY et al., 1998; ZAMBON, 1996). Tão importante quanto a presença da placa bacteriana é a sua composição e a sua complexidade. Os microrganismos periodontopatogênicos possuem alto grau de virulência, com capacidade de colonizar as superfícies dentárias subgengivais, produzir substâncias lesivas, como proteases e endotoxinas (LPS), orquestrar os mecanismos imunes destrutivos e ser resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro (KANTRONG; TO; DARVEAU, 2019; PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

Os periodontopatógenos são em geral Gram-negativos, anaeróbios e, menos frequentemente, microaerófilos. Essas bactérias são capazes de promover uma

degradação dos tecidos periodontais, por meio da liberação de uma variedade de produtos biologicamente ativos como, ácidos orgânicos, peptídeos quimiotáticos e toxinas proteicas (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; OFFENBACHER, 1996).

A organização dessas bactérias em um biofilme complexo permite que haja uma interação e cooperação entre elas, e características de cada espécie são usadas em benefício da colônia. Com isso, as bactérias conseguem driblar os mecanismos de defesa e proteção do hospedeiro, e promover a progressão da lesão e o ambiente anaeróbico, propício para a sua sobrevivência. Existem diversos grupos de periodontopatógenos divididos em função da sua virulência, sendo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*), *Tannerella forsythia*, *Eikenella corrodens* e *Treponema denticola* os representantes dessas espécies mais virulentas estudadas na doença periodontal (ALBANDAR, 2002; JEPSEN et al., 2018; ZAMBON, 1996).

Interessantemente, os produtos de virulência das bactérias promovem a modulação da resposta do hospedeiro. Essas alterações são causadas por meio diversos mecanismos, dentre eles os epigenéticos. Produtos, como o LPS, foram descritos como potenciais modificadores da expressão de proteínas relacionadas à alteração do padrão de metilação nas células humanas (REMELY et al., 2014; UEHARA et al., 2014).

Uehara et al. (2014) avaliaram a influência inibitória do LPS de *P.gingivalis* na diferenciação osteoblástica de fibroblastos derivados do ligamento periodontal humano. Eles verificaram uma hipermetilação e diminuição da transcrição do gene *RUNX2*, relacionado a diferenciação de osteoblastos, nas culturas de células de fibroblastos quando estes eram estimulados com LPS. Além disso, observaram o aumento da expressão da enzima DNA methyltransferase I (DNMT1), associada a manutenção da metilação de DNA nas células filhas.

Camargo Pereira et al. (2013) observaram que culturas de queratinócitos estimuladas com LPS de *P.gingivalis* apresentavam uma redução na transcrição de mRNA das DNMT1 e DNA methyltransferase 3a (DNMT3a) e Jumonji domain containing 3 (JMJD3), enzimas que participam no processo de metilação e desmetilação do DNA.

Esses achados mostram que a exposição de linhagens celulares presentes no periodonto ao LPS de *P.gingivalis* pode alterar eventos epigenéticos e modular as respostas moleculares locais.

1.2.2 Resposta imunoinflamatória

A evolução da doença decorre do desequilíbrio entre resposta imunoinflamatória do hospedeiro e os estímulos periodontopatogênicos. O processo de desencadeamento da periodontite se inicia quando os estímulos bacterianos conseguem romper os mecanismos de proteção do hospedeiro. Um dos primeiros eventos que acontece é a infecção tecidual. As bactérias conseguem ultrapassar 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; WATANABE; LAMONT, 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; 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. Tal fato provoca a migração, primeiramente de neutrófilos e, posteriormente, de macrófagos/monócitos e também linfócitos (BENEDETTO et al., 2013; HANS; HANS, 2011; SCHOLTEN et al., 2017). 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 (BENEDETTO et al., 2013). Com a lesão instalada, o processo inflamatório adquire um caráter imune adaptativo. A inflamação promove 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 (LINDHE; LANG, 2018; 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 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 T helper1 (Th1) e T helper2 (Th2). Os linfócitos B constituem a maior porcentagem (50%) do número de linfócitos em tecidos gengivais com inflamação intensa, ao passo que os linfócitos T constituem a maior porcentagem (60%) do infiltrado em tecidos com inflamação menos intensa, representados pelos subtipos celulares Th1, Th2, T helper 17 (Th17) e T reguladora (Treg) (AN; IHAN; IHAN, 2006; PARACHURU et al., 2014).

Os linfócitos T possuem papel crucial na evolução da periodontite. Eles são importantes para o controlar a periodontite via fagocitose de microrganismos. Os linfócitos Th1 são células responsáveis pela resposta imune celular e produzem, principalmente, Interferon gama (IFN- γ), citocina ativadora de macrófagos. Os macrófagos 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 são responsáveis pela resposta humoral, com a produção de citocinas que promovem a remoção dos patógenos e a proteção contra infecções, e a estimulação de células B a produzirem imunoglobulina, por exemplo (BENEDETTO et al., 2013; OHLRICH; CULLINAN; SEYMOUR, 2009).

Já os linfócitos Th17 são produtores da interleucina 17 (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* (MCALEER; KOLLS, 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; HUGHES; TAAMS, 2014).

Existem, ainda, linfócitos T autorreativos que reconhecem componentes próprios, como o colágeno tipo I e a proteína *HSP60* (*heat shock protein-60*) (CHOI et al., 2011; JEONG et al., 2015; PARACHURU et al., 2014). A proteína *HSP60* é uma molécula encontrada no patógeno mais comum na periodontite, 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 *HPS60*, 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 (HERNÁNDEZ et al., 2011).

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 TGF- β (inibidor de proliferação e função efetora de células T e ativação de macrófagos) e IL-10 (inibidor de macrófagos ativados e de células dendríticas) (NGUYEN et al., 2019; TAO et al., 2016).

1.2.3 Citocinas, diferenciação celular e vias de sinalização.

Citocinas são moléculas usadas na comunicação intercelular, produzidas pelas células, capazes de modular o seu próprio comportamento. Existe um extenso número de moléculas que fazem parte desse grupo e elas podem desempenhar funções pró- ou anti-inflamatórias (PAN; WANG; CHEN, 2019).

No periodonto, as citocinas possuem um papel crítico tanto na manutenção da homeostasia quanto nos processos inflamatórios por serem a primeira reação celular frente aos patógenos. Com isso, elas conseguem estimular as barreiras celulares de proteção e induzir o recrutamento de populações celulares relacionadas a defesa do organismo. Elas são geralmente associadas aos leucócitos, mas podem ser produzidas por diversos tipos celulares como células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais em resposta a agressões químicas, mecânicas e a microrganismos (BENEDETTO et al., 2013; GARLET, 2010).

A exposição dos tecidos periodontais a microbiota oral é constante e existe um equilíbrio entre o estímulo bacteriano e a resposta imune local. Devido a isso, células imunes residentes (compostas por fagócitos mononucleares, células apresentadoras de antígeno, células Th17) são constantemente detectadas em indivíduos com o periodonto saudável bem como pequenos níveis de produção de citocinas. Mas, se esse equilíbrio é rompido, com a formação do biofilme periodontopatogênico, o estímulo bacteriano se intensifica, assim como o infiltrado inflamatório e a produção de citocinas (AN, 2006; HAJISHENGALLIS e SAHINGUR, 2014).

Na periodontite, o aumento na secreção das citocinas pró-inflamatórias das famílias IL-1 (IL-1 β), IL-6, e fator de necrose tumoral (TNFs - TNF- α) pelas células epiteliais e fibroblastos, Th17 e células mielóides, desencadeiam o processo inflamatório. Essas citocinas recrutam e estimulam as células Th1 e Th2 (IL-1 β), Th17 e células B (IL-6), além de induzirem a atividade celular destrutiva de osteoclasto, células epiteliais e fibroblastos (KARTHIKEYAN et al., 2015; OHLRICH; CULLINAN; SEYMOUR, 2009). Com a progressão da doença, há um aumento na produção dessas citocinas e intensificação de suas ações. A diversificação do infiltrado inflamatório também é acompanhada pelas citocinas produzidas (FIGUEREDO; LIRA-JUNIOR; LOVE, 2019).

As citocinas podem induzir a diferenciação celular e também direcionar a atividade e o perfil inflamatório. Algumas citocinas que participam da indução da diferenciação celular são a IL-12, IL-23, IL-1 α , IL-2, TGF- β e IL-4. A IL-12 participa da diferenciação de Th1. Já a IL-23 e IL-1 α participa da diferenciação de Th17. IL-2 e TGF- β participam da diferenciação de Treg e são produzidas por células T CD4⁺ e células mielóides. Já a IL-4, que induz a diferenciação de Th2, é produzida apenas pelas células T CD4⁺ (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; GARLET, 2010; ROCHMAN; SPOLSKI; LEONARD, 2009).

Outras citocinas têm o papel de indução de atividade celular e perfil inflamatório. As IL-4, -5, -13 e -6, produzidas por Th2, estimulam as células B a produzirem anticorpos. As IL-35, -10 e TGF- β , produzidas pelas Treg, possuem ação anti-inflamatória nas células mielóides e Th17. Estas, por sua vez, produzem a IL-17 e -22, que possuem tanto papel anti-inflamatório sob as células epiteliais, estimulando a barreira celular, quanto pró-inflamatório, na estimulação de osteoclastos

(BIRKEDAL-HANSEN, 1993; GARLET, 2010; ROCHMAN; SPOLSKI; LEONARD, 2009).

A produção das citocinas, e sua efetiva ação sobre os processos celulares inflamatórios, dependem da ativação de receptores de membrana, de moléculas de sinalização e fatores de transcrição e tradução. Após a ativação de receptores através de citocinas, ou outras moléculas como o LPS, é acionada uma cascata de sinalização para determinar a expressão gênica necessária para a resposta ao estímulo. Existe uma variedade de vias que podem ser acionadas e algumas delas foram estudadas em humanos e em modelos experimentais. Dentre elas destacam-se as vias JAK/STAT, SOCS, MAPK, SMAD pelo amplo espectro de ativação molecular acionado a partir delas. Essas vias, por sua vez, levam a ativação de fatores de transcrição e tradução que definem fenótipos celulares e produção de citocinas, como o FOXP3 e os STATs. Ainda assim, uma gama de moléculas participantes dos processos e sua regulação, não foram elucidados na doença (ABLE; BURRELL; STEPHENS, 2017; BABON; NICOLA, 2012; BIRKEDAL-HANSEN, 1993; PAN; WANG; CHEN, 2019; STARR; HILTON, 1998; YAMAOKA et al., 2004). Exemplos dessas vias podem ser vistos na **Figura 4**.

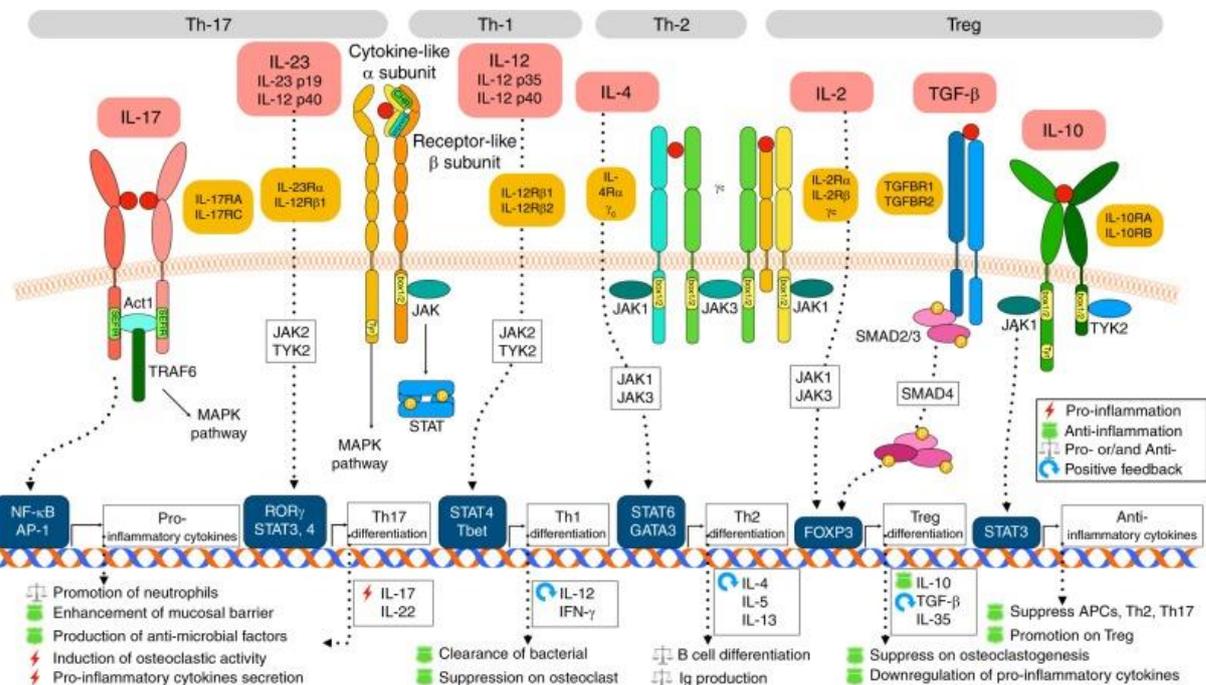


Figura 4 Citocinas, receptores e vias de sinalização relacionadas a produção de citocinas na periodontite. Fonte: (Pan, Wang and Chen, 2019).

Uma desregulação de citocinas pode levar ao início ou a uma aceleração do processo inflamatório. Algumas alterações genéticas e epigenéticas já foram detectadas em genes de citocinas e relacionadas à patogênese da periodontite. Polimorfismos nos genes das IL-1, IL-8 e TNF- α foram identificados nas diferentes populações mundiais e se relacionam com o aumento no risco de desenvolvimento da doença (BOUKORTT et al., 2015; DING et al., 2014; TANAKA et al., 2017).

A suscetibilidade do indivíduo à periodontite pode estar relacionada à regulação da atividade de genes com perfil imunoinflamatórios. A regulação dinâmica da expressão gênica pode ser feita por mecanismos epigenéticos que alteram o estado do genoma sem alterar a sequência de bases do DNA. O estado do genoma modificado por alterações epigenéticas é chamado de epigenoma (GOPISETTY; RAMACHANDRAN; SINGAL, 2006).

Inflamações crônicas e diferentes agentes infecciosos são alguns dos fatores que podem modificar o estado do epigenoma. Sendo assim, a investigação de mecanismos epigenéticos em genes da resposta imune nos indivíduos com doença periodontal é necessária para entender melhor a patogênese da periodontite (GOMEZ; DUTRA; MOREIRA, 2009; PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005; RICHTER et al., 2021).

Mudanças nos padrões de metilação de DNA foram avaliados em genes de citocinas inflamatórias na periodontite. Uma hipometilação e um aumento na expressão foi vista em pacientes com periodontite nos genes das citocinas IL-6, -8 e IFN- γ ; já uma hipermetilação no gene *TNFA* foi observada (ISHIDA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2009; VIANA et al., 2011; WHITE et al., 2002; ZHANG et al., 2013)

Embora os estudos sobre os genes das citocinas tenham contribuído para o entendimento dos processos de produção das citocinas, alterações epigenéticas em outros genes, como nos genes relacionados às vias de sinalização, podem ser relevantes. Mudanças no perfil de metilação foram detectadas nos genes das vias SOCS e SMAD, que se mostraram hipermetilados e relacionados com a gravidade da doença (ANDIA et al., 2015; BAPTISTA et al., 2014; ZHANG et al., 2018). Contudo, a maioria dos trabalhos até então publicados têm avaliado os mecanismos de regulação em genes pontuais nas vias de produção de citocinas.

1.3 Genes e vias que participam da sinalização celular para a produção de citocinas

1.3.1 *FOXP3*

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* é comumente 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 (TAO et al., 2016). Desordens na expressão do *FOXP3*, podem causar alterações nas células Treg, podem ser a causa de complicações linfoproliferativas fatais e agressivas, como desregulações imunes, IPEX (síndrome ligada ao X) e poliendocrinopatias (RUDENSKY, 2011; VOSKUHL; SAWALHA; ITOH, 2018; ZHAO; LIAO; KANG, 2017).

O *FOXP3* é um fator de transcrição cuja função é suprimir genes relacionados aos 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, como por exemplo, o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e o fator nuclear K β (NF- κ B). 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- κ B, reprimindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12 e IL-15 (DEVAUD; DARCY; KERSHAW, 2014; LAL et al., 2012; ZHAO; LIAO; KANG, 2017).

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 5**. 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; HUEHN, 2011).

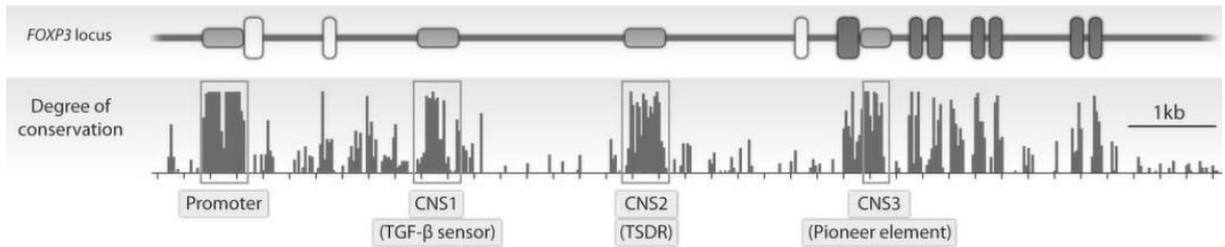


Figura 5 Lócus do gene *FOXP3*, seu promotor e as regiões conservadas de DNA não codificante. Fonte: Token e Huehn, 2011

Existem dois tipos principais 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. 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; SABARISH; RAO; LAVU, 2016) . 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 et al., 2009). 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 (CAMPOS et al., 2015; TAO et al., 2016; WIERDA et al., 2010).

Na periodontite, o paradigma inflamatório clássico caracterizado pela polarização de resposta Th1-Th2 deu lugar a um novo modelo com a inclusão de outros componentes celulares como as células Th17 e Treg (BITTNER-EDDY; FISCHER; COSTALONGA, 2020; DE VRIES et al., 2017; PARACHURU et al., 2014). As células Th17 e Treg possuem funções opostas na patogênese da periodontite e a avaliação da proporção Th17/Treg é um indicador importante de progressão da doença (DUTZAN; ABUSLEME, 2019; MEDARA et al., 2021).

A atividade osteolítica, com a reabsorção óssea alveolar, é um dos desfechos mais característicos da periodontite e é, em parte, resultado do balanço entre a atividade das células Th17 e a atividade imunossupressora das células Treg (ALVAREZ et al., 2020). As células Th17 possuem função pró-inflamatória devido a habilidade de recrutar PMNs e macrófagos através da produção de IL-17A e TNF-α. Já as Treg possuem uma ação regulatória e suprimem a atividade celular de células efetoras através de citocinas como a IL-10 e TGF-β1. A IL-17A induz a expressão de

RANKL, e estimula a reabsorção óssea, enquanto a manutenção do tecido ósseo é promovida pela IL-10 e TGF-B (BITTNER-EDDY; FISCHER; COSTALONGA, 2020; DUTZAN et al., 2009). As células Treg são importantes na saúde nos tecidos periodontais por manterem a homeostasia e defesa dos tecidos moles, controle da inflamação e controle da reabsorção óssea alveolar. E, como mencionado anteriormente, a função dessas células está ligada a expressão de FOXP3 (ALVAREZ et al., 2018).

Cardoso et al. (2008) avaliaram a presença de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ em tecidos gengivais de pacientes com periodontite. Eles observaram uma maior proporção de células FOXP3⁺, além da maior expressão de mRNA de FOXP3 e de outros marcadores de Treg, como IL-10 e TGF-β, quando comparados a pacientes controle. Segundo os autores, as células nTreg são atraídas para os locais de infecção e inflamação nos pacientes periodontais e podem estar desempenhando papel importante na resposta do hospedeiro e na cronicidade da doença. Parachuru et al. (2018) também verificaram maiores proporções de células FOXP3⁺ em tecidos gengivais inflamados de pacientes com periodontite, por meio da técnica de imunofluorescência, além da maior expressão de mRNA de STAT5A. Dutzan et al. (2009) observaram uma maior expressão de FOXP3 em lesões periodontais ativas, além de IL-17, RANKL, IFN-γ, TGF-β1.

A expressão de FOXP3 parece estar alterada não só entre pacientes saudáveis e com periodontite. Motta et al. (2020) observaram diferenças na proporção de células FOXP3⁺ entre pacientes periodontais com diferentes estágios da doença. (periodontite estágio III grau B e estágio IV grau C). As amostras de pacientes periodontais estágio III grau B apresentaram as maiores proporções dessas células. Sobre a dinâmica das células FOXP3 na patogênese, a proporção de células FOXP3⁺ aumenta ao longo do tempo em pacientes periodontais que mantêm uma boa higiene e controle da saúde periodontal (MEDARA et al. 2021)

Apesar de estudos recentes mostrarem a importância da participação do FOXP3 na periodontite, o fator de regulação epigenético mais importante na regulação da sua atividade ainda não foi estudado. Uma vez que as células Treg (naturais ou induzidas) possuem função fundamental na regulação dos processos inflamatórios, (CARDOSO *et al.*, 2008), o estudo do perfil de metilação do *FOXP3* nos tecidos gengivais de indivíduos com periodontite pode esclarecer os mecanismos envolvidos na transcrição desse gene na doença.

1.3.2 Via JAK/STAT

A via de sinalização JAK-STAT representa uma importante forma de comunicação responsável por diversas funções como diferenciação e proliferação celular, apoptose e respostas imunológicas. Nessa via, os estímulos recebidos pelos receptores de membrana ativam as proteínas tirosinas quinases associadas, chamadas *receptor-associado Janus kinases* (JAKs), que quando ativadas conseguem transmitir a informação para o núcleo através da molécula citoplasmática *transdutora de sinal e ativadora de transcrição* (STATs) (ABLE; BURRELL; STEPHENS, 2017).

As JAK estão constitutivamente localizadas nas regiões proximais a receptores de citocinas e sua associação com os STATs é uma das formas mais comuns de transmissão de sinais intracelulares. A via JAK/STAT representa uma das vias de sinalização mais rápidas entre o meio externo e intranuclear, pelo fato dos STATs alcançarem o ambiente nuclear imediatamente depois sua fosforilação, sem uma cascata de sinalização complexa. Logo após a ligação de uma citocina ao seu receptor específico na superfície celular, as JAKs associadas ao receptor sofrem uma transfosforilação, o que causa uma auto-ativação. As JAKs ativadas então promovem uma fosforilação em tirosinas específicas nas caudas citoplasmáticas dos receptores que, por sua vez, se modificam e se tornam locais de ancoragem para as STATs. Com a ancoragem, os STATs são fosforilados pelas JAK, o que causa a sua dissociação com o receptor e sua translocação para o núcleo, onde irá guiar a expressão de genes específicos (**Figura 6**) (MORRIS; KERSHAW; BABON, 2018).

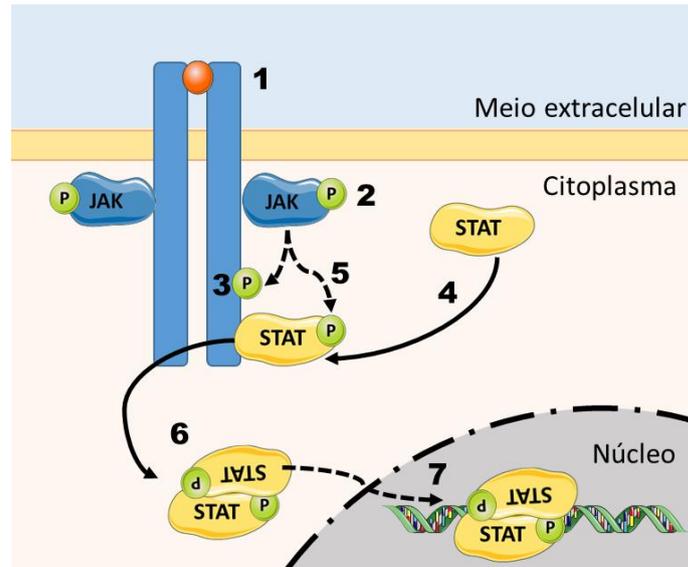


Figura 6 Via JAK/STAT: 1-ligação receptor-ligante; 2-transfosforilação da JAK; 3-Fosforilação da cauda citoplasmática do receptor e liberação do local de ancoragem para a STAT; 4-migração da STAT para o local de ancoragem; 5-Fosforilação da STAT por meio da JAK; 6-Formação do dímero; 7- Translocação para o núcleo. Fonte: produzido pelo autor.

Existem sete membros da família STAT nos mamíferos: STAT1, STAT2, STAT3, STAT5A, STAT5B e STAT6; todos com funções de transmissores de sinal e fatores de transcrição. Para tal, os membros da família STAT devem sofrer fosforilação para desempenharem essas funções e isso é comumente feito através das JAK, sendo também possível através de outras tirosinas quinases como a Flt3R e a piruvato quinase (VILLARINO; KANNO; O'SHEA, 2017). Em suma, os diversos receptores de citocinas (tipo I e II) podem se associar aos quatro tipos de JAK, que por sua vez interagem com os sete tipos de STATs que vão direcionar a expressão gênica, mas não de forma genérica. Existe uma correlação entre os receptores, as JAKs e os STATs, o que fornece uma gama de interações e dão origem a diferentes vias, com resultados celulares diferentes. Um exemplo disso é o fato de que uma mesma citocina, ou ligante, pode acionar vias JAK/STAT diferentes, e dependendo do tipo celular que isso ocorre, pode ter implicações divergentes em uma mesma doença (BANERJEE et al., 2017).

Além de transmissão de sinais, os STATs têm como função a atuação como fatores de transcrição. Após sua fosforilação, e consequente ativação, os STATs formam dímeros (homodímeros ou heterodímeros), alcançam o núcleo e ali atuam na regulação de expressão gênica. A determinação do grupo exato de genes regulados por cada STAT é dificultada devido a interação com outros fatores de transcrição durante a expressão. Atualmente, dados da literatura ajudam a esclarecer sobre essa

especificidade e os subtipos *STAT5A* e *STAT5B* se destacam pelo papel na sobrevivência celular e resposta imune inflamatória (KORNFELD et al., 2008)

1.3.2.1 *STAT5A*

Os genes de *STAT5A* e *STAT5B* estão localizados no cromossomo 17 e suas proteínas possuem aproximadamente 96% da sua constituição de aminoácidos similar, além de compartilharem grande parte de seu arsenal funcional. Os *STAT5s* participam da transdução de sinal de vários ligantes e a sua ativação resulta na regulação de inúmeros genes chave em processos de apoptose celular, sobrevivência e proliferação (BANERJEE et al., 2017; WEI; LAURENCE; O'SHEA, 2008).

Essas proteínas podem sofrer muitas modificações pós transcricionais como glicosilação, ubiquitinação e fosforilações, o que permite uma vasta gama de interações com outras moléculas no processo de regulação gênica. Desse modo, vários tipos celulares utilizam dessa ferramenta versátil na modulação do transcriptoma em resposta a estímulos externos (KORNFELD et al., 2008).

Tendo em vista essa capacidade de resposta, essas proteínas são amplamente utilizadas pelas células em processos inflamatórios. A função dos *STAT5s* está relacionada a processos moleculares que ocorrem em células imunes como o desenvolvimento linfocitário, atividade das células NK, função citotóxica de células T, funções de células T helper e Treg, atividade de mastócitos e resposta de macrófago (DAI et al., 2007; KORNFELD et al., 2008; SHELBURNE et al., 2003; WEI; LAURENCE; O'SHEA, 2008). Sendo assim, doenças de caráter inflamatório podem sofrer influência da atividade dessas moléculas e que podem definir em grande parte o perfil de resposta celular.

Na periodontite, o infiltrado inflamatório observado é composto por células mononucleares, predominantemente linfócitos, e também se observa a perda de tecido ósseo alveolar. O fator de transcrição *STAT5A* se destaca no contexto da patogênese da periodontite pelo seu papel no desenvolvimento linfocitário e na regulação da atividade osteolítica (ARAUJO-PIRES et al., 2014; SILVA et al., 2015; TAUBMAN et al., 2005).

Os *STATs* de maneira geral participam do desenvolvimento de células T, mas a ativação de *STAT5A*, especificamente, está relacionada a polarização da população Th2 e ao desenvolvimento de células Treg (KAGAMI et al., 2001; WEI; LAURENCE; O'SHEA, 2008). O processo de polarização de Th2 é induzido pelo estímulo da IL-4

com a participação das STATs 6 e 5A na regulação de expressão gênica. Porém, mesmo na ausência de STAT6, a população de Th2 não sofre deleção (KAGAMI et al., 2001; TAKATORI et al., 2005). Já em relação as células Treg, o STAT5A possui papel central na indução da expressão de FOXP3, que por sua vez define o fenótipo celular (JENKS et al., 2013). Sendo assim, o gene STAT5A está relacionado a polarização de populações celulares de caráter imunossupressores.

Além disso, o STAT5A participa dos processos de osteogênese e osteoclastogênese, dependendo da via de interações moleculares. A ativação de STAT5A por IL-3 inibe a diferenciação dos osteoclastos e, conseqüentemente, a osteoclastogênese (LEE et al., 2016). Já a sua inibição, estimula a ativação da molécula *distal-less homeobox 5* (DLX5) em células da medula óssea, o que promove a osteogênese (LEE et al., 2018).

Outra função de STAT5A está relacionada a produção de citocinas. A atividade de STAT5A induz a produção das citocinas IL-2, IL-6, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-21. Essas citocinas têm função na defesa do hospedeiro contra patógenos externos e também na imunorregulação e sobrevivência celular (ABLE; BURRELL; STEPHENS, 2017). A literatura mostra que a atividade de STAT5A pode ser influenciada por metilação de DNA por meio da redução da expressão de mRNA (STEFANOWICZ et al., 2012)

A avaliação do STAT5A na periodontite ainda é incipiente apesar de sua importância em processos inflamatórios. Parachuru et al. (2018) avaliaram expressão de STAT5A em tecidos gengivais de lesões periodontais e verificaram que se apresenta em maior proporção quando comparada aos pacientes controle. Já Azevedo et al. (2020) observou que pacientes periodontais apresentavam um perfil hipometilado do gene *STAT5A* em tecidos gengivais de pacientes com periodontite grave.

1.3.3 MALT1

MALT1 (*mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*) é uma proteína citosólica de sinalização que possui papel central na imunidade e inflamação, expressa em diversos tipos celulares. O gene do MALT1 se localiza no cromossomo 18, região 18q21.32, e é mais expresso em regiões de grande atividade linfocitária, como os linfonodos e locais de inflamação (HACHMANN; SALVESEN, 2016).

A principal função de MALT1 é a ativação do fator de transcrição NFkB com a co-participação da proteína BCL10, desencadeado por ligantes com proteínas na superfície da membrana celular. Essa molécula pode ser tanto uma proteína de ancoragem, para a interação com outras proteínas na transdução de sinal, quanto uma paracaspase com função proteolítica (JAWORSKI; THOME, 2016).

Em sua função de ancoragem, MALT1 interage com as proteínas TRAF6, LUBAC e TAK1 para ativar o complexo IKK, que por sua vez fosforila e inativa o inibidor do NFkB. Já sua função de protease, MALT1 modifica e ativa as proteínas do complexo NFkB, RelB e A20; as proteínas Regnase-1 e Roquin 1/2 com função de estabilização de mRNA de IL-2, IL-6 e IL-12; e a proteína BCL10 com função de adesão celular (HACHMANN; SALVESEN, 2016).

MALT1 também participa da caracterização do fenótipo celular de linfócitos através de sua atividade proteolítica. Na linhagem das células B, MALT1 é responsável pelo desenvolvimento do subtipo B1 na periferia, responsável pela resposta humoral durante infecções. Nas células T, a atividade de MALT1 se relaciona com o desenvolvimento de células nTreg no timo mas com a inibição de iTreg periférico, além disso induz a diferenciação de células Th17 (BRÜSTLE et al., 2017; REBEAUD et al., 2008).

Alterações na atividade de MALT1 têm sido reportadas em doenças de caráter inflamatório. A inibição de MALT1 está relacionada com o desequilíbrio entre as respostas de células T e B, que resulta em inflamações teciduais em órgãos como o intestino, pele e pulmão. Ao mesmo passo que a sua atividade está relacionada a progressão de linfomas, câncer e doenças autoimunes. (BORNANCIN et al., 2015; DEMEYER; STAAL; BEYAERT, 2016).

Ainda foi não verificado o papel de MALT1 na periodontite, mas alguns estudos apontam uma possível influência da cascata de MALT1 na ativação de processos inflamatórios desencadeados por infecções bacterianas e seus produtos (FISCHER; TEDFORD; WIRTH, 2004; NAKAMURA et al., 2008). Alterações periodontais, como úlceras e gengivites, são achados comuns em pacientes com deficiência congênita de MALT1 (LU; TURVEY, 2021). Ademais, Monajemi *et al.*, (2019) apontaram um aumento na atividade osteoclástica em animais deficientes em MALT1, o que sugere seu papel na degradação óssea. Apesar disso, alterações na atividade de NFkB, principal alvo de MALT1, têm sido reportadas em trabalho que

avaliou pacientes com periodontite, o que pode sugerir uma co-participação de MALT1.

1.3.4 LTB

Linfotoxina- β (LT β) é uma proteína ligante, expressa na forma ligada a membrana. Ela estimula os membros da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFRSF) expresso na superfície de vários tipos celulares, em especial na linhagem de linfócitos. Normalmente forma heterotrímeros com outro ligante da mesma família, linfotoxina- α (LT α), e representa uma forma comum e rápida de comunicação entre as células. LT β está exclusivamente ligada a membrana e sua associação com LT α –encontrada na forma solúvel em homotrímeros - pode formar pelo menos duas variações (LT $\alpha_1\beta_2$, LT $\alpha_2\beta_1$). A forma LT $\alpha_1\beta_2$ se liga e ativa os receptores TNFR1 e TNFR2, já a forma LT $\alpha_2\beta_1$ apenas ativa o receptor LT β R. As variações de LT $\alpha\beta$ também podem ser clivadas e liberadas da membrana, podendo ativar outras células a distância. A estimulação dos receptores TNFR1 e LT β R, assim como a maioria dos receptores TNFRSF com seus ligantes, ativam a via de sinalização de NF κ B e estimulam a sobrevivência celular, proliferação, diferenciação e apoptose (BAUER et al., 2012).

O papel de LTB na ativação dos TNFRSF torna-o um importante alvo para os estudos na periodontite. Recentemente, o perfil de metilação de LTB foi avaliado nos tecidos gengivais de indivíduos com periodontite grave e um perfil hipometilado foi observado tanto na periodontite quanto no controle (AZEVEDO et al. 2020).

1.2.4 Epigenética e periodontite.

Em nosso genoma estão codificadas todas as informações que nos fazem ser o que somos. 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 (GOPISETTY; RAMACHANDRAN; SINGAL, 2006). 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. Ao contrário do nosso genoma, mais estável ao longo da vida, o epigenoma pode estar

em constante mudança, a fim de adequar nossas respostas aos estímulos ambientais (BAYARSAIHAN, 2016).

O epigenoma também é responsável pela identidade celular através da manutenção do padrão de expressão específico. Exemplo disso é o fato de um neurônio e um queratinócito compartilharem o mesmo genoma, mas a organização molecular e a manutenção do padrão de expressão genética serem definidas pelo epigenoma. Durante processos patológicos, o arsenal de defesa e reparação, e a alteração fenotípica celular, são ordenados também pelas mudanças epigenéticas. Sendo assim, alterações no epigenoma podem estar relacionadas tanto a fisiologia e homeostasia quanto aos processos patológicos (CAVALLI; HEARD, 2019).

O maquinário epigenético é composto por diversos mecanismos como a acetilação de histonas, metilação de DNA e RNA não codificantes. 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 com a formação de uma 5-metilcitosina – 5mC - (**Figura 7**) (XU e DU 2010).

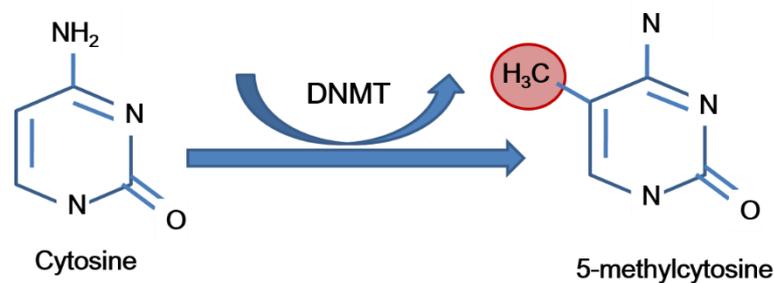


Figura 7 Metilação do DNA. Adição do grupo metil a uma citosina. DNMT (DNA methyl transferase). Fonte: Adaptado de Attwood et al. (2002).

A adição de metil à citosina é mediada por uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMT) e são conhecidos cinco tipos: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. A DNMT1 medeia a metilação de fitas hemimetiladas, correspondentes as fitas de DNA recém-sintetizadas durante a fase S na divisão celular. Por isso, é conhecida por ser responsável pela hereditariedade do padrão de metilação global. A DNMT2 ou TRDMT1 participa do reconhecimento de dano, recombinação e reparo de DNA, além de participar da metilação em fitas de RNA e proteção de RNA transportador (tRNA) sob condições de estresse. Já as DNMT3a, 3b e 3L são responsáveis pelo estabelecimento de um novo padrão de metilação em citosinas não modificadas, assim conhecidas como *de novo* DNMTs

(SUBRAMANIAM et al., 2014; TAJIMA et al., 2016; TUREK-PLEWA; JAGODZIŃSKI, 2005).

A maior fonte de grupos metil (CH_3) é derivada da alimentação (vitamina B12, B6, folato, colina e betaína) que fornece metionina ou outros compostos modificados, e são carregados pelo co-fator S-adenosil-metionina (SAM) até os sítios de ação das DNMTs. A metilação de DNA é fundamental para diversos processos biológicos como silenciamento de elementos retrovirais, expressão gênica tecido-específica, *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X (SHARMA et al., 2017).

Em contrapartida, existe um evento ainda pouco descrito, que parece lidar com o processo de desmetilação do DNA. O 5mC pode sofrer oxidação e se transformar em 5-hidroximetilcitosina – 5hmC – por meio da ação de uma família de enzimas chamadas *ten-eleven translocation* (TET). A função de 5hmC ainda não está clara, mas parecer ser um mecanismo de desmetilação de DNA e reativação do promotor gênico (LIO; RAO, 2019; RASMUSSEN; HELIN, 2016).

A metilação de DNA ocorre comumente no carbono na posição 5 de citosinas dos dinucleotídeos CpG. As ilhas CpGs são regiões do genoma com maior frequência de CpG e onde estão localizados a maioria dos lócus promotores. Cerca de 50-60% de todos os nossos genes possuem ilhas CpG (BARROS; OFFENBACHER, 2009). O silenciamento gênico ocorre devido à presença do grupo metil nos promotores gênicos, o que impede a interação destes com a maquinaria de transcrição (SUBRAMANIAM et al., 2014). 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 (BARROS; OFFENBACHER, 2009).

Muitos fatores podem influenciar e modificar o padrão de metilação em genes e tipos celulares específicos. Diabetes, tabagismo, obesidade, estresse, infecções são alguns desses fatores. A própria resposta imunoinflamatória é um potencial modificador de metilação (LARSSON; CASTILHO; GIANNOBILE, 2015; LINDROTH; PARK, 2013). Assim, a periodontite apresenta dois fatores principais e potenciais modificadores de padrão de metilação, o estímulo bacteriano e uma condição inflamatória local. O LPS, e outros antígenos bacterianos, foram descritos como modificadores de metilação de genes codificadores das moléculas como *Matrix Metalloproteinase 2* (MMP2), TLR2 e indutores de expressão de DNMTs em células humanas (DE FARIA AMORMINO et al., 2013; SAITO et al., 2003; TAKAI et al., 2016).

O perfil de metilação de DNA nos genes inflamatórios tem sido investigado em biópsias gengivais de pacientes com periodontite em alguns estudos (JURDZIŃSKI; POTEPA; GRABIEC, 2020). Barros e Offenbacher (2014) verificaram que a metilação de DNA era maior em pacientes com periodontite nos genes da *IL6*, *IL17*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL10*, *IL6ST*, *TNFRSF18*, *SOCS3*, *RUNX*, *GATA3* quando comparados aos pacientes saudáveis, enquanto os genes *IL8*, *IL4R*, *STAT5A* estavam menos metilados. O mesmo perfil hipometilado para o gene *STAT5A* nos pacientes com periodontite foi observado no trabalho de Azevedo *et al.*, (2020). Já Faria Amormino *et al.*, (2013) observou um perfil hipermetilado para o gene *TLR2* e uma diminuição da transcrição nos pacientes doentes comparados aos controles.

Todo esse panorama indica que a metilação de DNA pode influenciar os diversos processos desencadeados pela periodontite. A produção de citocinas é um dos mecanismos mais alterados no processo inflamatório da doença e sua regulação depende de várias vias de sinalização. Tendo isso em vista, o estudo acerca dos padrões de metilação em genes de moléculas relacionadas com as vias de produção de citocinas se torna necessário para melhor compreender a doença. Essas modificações podem influenciar as atividades celulares e moleculares do hospedeiro frente ao desafio bacteriano, interferindo no processo de desenvolvimento e progressão da doença. A investigação de mecanismos epigenéticos em genes relacionados à via de sinalização na produção de citocinas se torna um campo promissor na periodontite.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a presença da metilação de DNA em genes relacionados com a via de sinalização da produção de citocinas em fragmentos de tecido gengival de indivíduos com periodontite e saudáveis.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a ocorrência de metilação em um painel de genes (*BCL10*, *BCL3*, *FOXP3*, *HMOX1*, *IL12A*, *MALT1*, *MAP3K7*, *SOD1*, *STAT5A*, *TRAF2*, *TRAF6*, *INHA*, *INHBA*, *GATA3*, *IRF1*, *SMAD3*, *IGF2BP2*, *ELA2*, *LTB*, *MYD88*, *NOD1*, *TLR2*) relacionados com a produção de citocinas em fragmentos de tecido gengival de indivíduos saudáveis e com periodontite, e entre os sexos.
- b) Identificar os genes do painel com perfil de metilação diferente entre os grupos estudados e confirmar os dados obtidos em um maior número de amostras de fragmentos de tecido gengival de indivíduos sem alterações periodontais e com periodontite, e entre os sexos.
- c) Avaliar a transcrição dos genes previamente selecionados e correlacionar com o perfil de metilação nos fragmentos de tecido gengival de indivíduos sem alterações periodontais e com periodontite, e entre os sexos.
- d) Avaliar associações da ocorrência de metilação e dos níveis de transcrição dos genes investigados com parâmetros clínicos.

3 MÉTODOS

3.1 População de estudo

A população do estudo foi composta por indivíduos saudáveis sem periodontite (n = 30) e indivíduos com periodontite (n = 30). Foram incluídos no estudo indivíduos atendidos na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no Centro de Especialidades Odontológicas de Venda Nova, Belo Horizonte, MG, Brasil, no período de 2013 a 2019. Todos os pacientes foram submetidos a anamnese, exame clínico e radiográfico por um periodontista experiente, previamente calibrado. Eles assinaram o termo de consentimento e foram informados sobre o objetivo e os métodos do estudo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (ETIC: 075/11)

Sinais clínicos de inflamação, nível de inserção clínica (NIC) e profundidade de sondagem (PS) foram usados como critérios para o diagnóstico de periodontite. Indivíduos sem evidência clínica e radiográfica de doença periodontal, $PS \geq 3\text{mm}$ e sem sangramento a sondagem foram usados como controle (grupo C). Aqueles que exibiram mais de três locais com $PS \geq 4\text{mm}$, $NIC \geq 5\text{mm}$ e sinais clínicos de inflamação foram considerados no grupo com periodontite (grupo P).

Os critérios de exclusão aplicados foram o uso de antibióticos, ou anti-inflamatórios nos últimos seis meses, gestantes ou lactantes, condições sistêmicas alteradas, elementos dentários com alterações periodontais, com exceção da periodontite no grupo periodontite (grupo P), menos de 15 dentes e histórico de tabagismo. A não ser pela presença de periodontite, os pacientes incluídos neste estudo eram sistemicamente saudáveis.

Para o grupo P, os tecidos gengivais foram coletados das bolsas periodontais durante a fase cirúrgica do tratamento periodontal. Uma área equivalente foi coletada durante exodontia e outras cirurgias eletivas para o grupo controle (grupo C), observando-se os parâmetros clínicos de saúde periodontal.

As amostras foram divididas em duas partes. Uma parte foi armazenada em solução RNAholder (BioAgency, Brasil) para avaliação de mRNA. A outra parte foi armazenada para análise de metilação de DNA em Tissue-Tek (Sakura, Torrance, CA, EUA). Os indivíduos foram categorizados de acordo com a nova classificação de

doenças periodontais da American Academy of Periodontology e da European Federation of Periodontology (Papapanou et al., 2018).

3.2 Extração e quantificação de DNA

Todos os fragmentos gengivais armazenados em Tissue-Tek (Sakura, Torrance, CA, EUA) foram incubados com proteinase K a 55 ° C até a digestão completa. As amostras foram submetidas à extração de DNA pelo DNeasy Blood & Tissue Kit (250) (Cat. No. 69506 / QIAGEN Sciences, Maryland 20874, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os gDNA obtidos foram quantificados em espectrofotômetro Denovix (DeNovix Inc. Wilmington, EUA). Consideramos como parâmetro de pureza as amostras que apresentaram DNAs com leitura da relação DNA / proteína (260/280) acima de 1,8 e relação (260/230) acima de 1,7. COLOCAR O PADRÃO JÁ É PREESTABELEBIDO

3.3 Análise do painel de metilação de DNA

Nesta etapa, agrupamos o gDNA extraído de 6 amostras de cada grupo em dois pools. Realizamos um painel de metilação de DNA contendo 22 genes usando o array PCR EpiTect Methyl II Signature Human Cytokine Production (produto nº 335212, catálogo nº EAHS 541Z, Qiagen, Maryland 20874, EUA) para cada pool. No painel foram avaliados os genes relacionados à produção de citocinas, compostos por moléculas que participam da via de sinalização, reguladores funcionais de células T e B, fatores de transcrição e tradução (*BCL10*, *BCL3*, *FOXP3*, *HMOX1*, *IL12A*, *MALT1*, *MAP3K7*, *SOD1*, *STAT5A*, *TRAF2*, *TRAF6*, *INHA*, *INHBA*, *GATA3*, *IRF1*, *SMAD3*, *IGF2BP2*, *ELA2*, *LTB*, *MYD88*, *NOD1*, *TLR2*), dados resumidos na **Tabela 1**. As amostras foram previamente tratadas pelo protocolo do EpiTect Methyl DNA Restriction Kit (Qiagen, Maryland 20874, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, que utiliza enzimas de restrição para identificar DNA metilado e não metilado. Conduzimos o ensaio quantitativo de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) em um instrumento StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os valores de Δ CT obtidos foram analisados por meio de software específico fornecido pelo fabricante e os níveis de metilação foram quantificados. Os genes que apresentaram padrões de metilação diferentes entre os grupos avaliados,

maior que 20%, foram selecionados para posterior análise com maior número de amostras.

Genes	Função
<i>BCL10, BCL3, HMOX1, IL12 A, MALT1, MAP3K7, SOD1, STAT5A, TRAF2, TRAF6</i>	Regulação da função de células T
<i>B BCL10, BCL3, INHA, INHBA, STAT5A</i>	Regulação da função de células B
<i>BCL10, BCL3, GATA3, IRF1, SMAD3, STAT5A, FOXP3</i>	Regulação da transcrição
<i>BCL3, IGF2BP2</i>	Regulação da tradução
<i>BCL10, BCL3, ELA2, GATA3, HMOX1, IL12A, INHA, INHBA, LTB, MALT1, MYD88, NOD1, SMAD3, SOD1, STAT5A, TLR, FOXP3</i>	Resposta ao estímulo intracelular e ambiental
<i>BCL10, BCL3, HMOX1, INHA, INHBA, LTB, MALT1, MAP3K7, MYD88, NOD1, SMAD3, SOD1, STAT5A, TLR2, TRAF2, TRAF6, FOXP3</i>	Sinalização molecular e produção de citocinas

Tabela 1 Genes avaliados no painel de metilação agrupados pelas funções celulares e moleculares.

3.4 Análise com ensaios individuais de metilação de DNA

Os genes que apresentaram perfil de metilação diferente entre os grupos na etapa anterior foram selecionados e analisados na amostra total coletada (n = 60) para confirmação dos dados obtidos no painel. Conforme descrito anteriormente, realizamos os mesmos procedimentos para extração de DNA, tratamento com enzimas de restrição e avaliação de qPCR. Os genes selecionados e a localização das respectivas ilhas CpGs são mostrados na **Tabela 2**.

Ensaio	Nº de catálogo (QIAGEN Sciences)	Localização da ilha CpG
MALT1	EPHS106651-1A	Chr18: 56338211 - 56339277
LTB	EPHS112342-1A	Chr6: 31548436 - 31549277
STAT5A	EPHS106010-1A	Chr17: 40440188 - 40441014
FOXP3	EPHS115010-1A	ChrX: 49125645 - 49127200

Tabela 2 Ensaio usado para avaliação de metilação

3.5 Extração e quantificação de RNA

Realizamos a extração de RNA usando o protocolo do reagente Trizol seguindo as recomendações do fabricante (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, EUA). O tecido gengival armazenado em RNAholder (Bio Agency Biotechnology, Brasil) foi cortado, macerado e homogeneizado com Tissue Grinder (Kondes, Vineland, NJ, EUA) em 1mL de Trizol, em seguida centrifugado a 12.000g / 10 min a 4 ° C. Resumidamente, 200µl de clorofórmio (Merck, Inc., White house station, NJ, EUA) foram adicionados ao sobrenadante, agitados em vórtex e incubados por 3 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a centrifugação foi realizada a 12000g / 10min a 4 ° C. A fase contendo o RNA foi transferida, adicionado 500µl de álcool isopropílico (Merck, Inc., White house station, NJ, EUA) e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação, o precipitado de RNA foi lavado com 1mL de álcool etílico 75% gelado (Merck, Inc., White house station, NJ, EUA). O sedimento de RNA foi seco à temperatura ambiente e, em seguida, diluído em 15 µl de água sem nuclease DEPC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

3.6 Síntese de DNA complementar – cDNA

Após a extração do RNA, as amostras foram submetidas ao tratamento com Desoxirribonuclease I, Grau de Amplificação (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Diluímos 1µg de RNA em volume final de 8µL, contendo 1µL de tampão e 1µL de enzima DNase. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, adicionamos 1µL de EDTA e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 70 ° C. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado após a reação de transcrição reversa usando o kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, EUA).

3.7 Análise da transcrição do gene

Avaliamos as amostras de cDNA pela técnica de qPCR com o uso do equipamento CFX96 (Biorad). As reações foram feitas com o ensaio de expressão

TaqMan_Gene para os genes selecionados e, como controle endógeno, foi usado o gene da beta-actina (**Tabela 3**). A expressão relativa do gene alvo foi calculada e normalizada com o gene endógeno. Avaliamos os resultados quanto à transcrição do gene alvo normalizado com o endógeno e relativo a uma amostra calibradora. A amostra de calibração foi formada por um pool de amostras de sangue de indivíduos saudáveis. Todas as reações foram realizadas em duplicata. A transcrição do gene foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Applied Biosystems User Bulletin No. 2) conforme descrito anteriormente (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Ensaio	ID (Applied Biosystems)	Localização do gene
MALT1	Hs01120060_m1	Chr.18: 58671386 - 58753806
LTB	Hs00242739_m1	Chr.6: 31580558 - 31582425
STAT5A	Hs00559643_m1	Chr.17: 42287547 - 42311943
FOXP3	Hs01085834_m1	Chr.X: 49250436 - 49266505
ACTB	Hs01060665_g1	Chr.7: 5527148 - 5530601

Tabela 3 Ensaio usado para avaliação da transcrição gênica

3.9 Análise estatística

Usamos o teste de Shapiro-Wilk para determinar o padrão de distribuição da amostra. Posteriormente, utilizamos o teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni nas análises estatísticas comparativas. Para a análise de correlação, empregamos a correlação de ordem de classificação de Spearman. Todas as análises estatísticas foram realizadas em SPSS 21.0 (IBM, Chicago, EUA). $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas e clínicas

A **Tabela 5** mostra os parâmetros demográficos e clínicos dos grupos C e P. Consistente com o diagnóstico e com a destruição do tecido de suporte dentário, os pacientes P apresentaram maior profundidade de sondagem, perda de inserção clínica e porcentagem de sangramento à sondagem do que os participantes C. O grupo P também apresentou perda óssea alveolar, detectada radiograficamente. Todos os pacientes incluídos no grupo P foram classificados com o diagnóstico de periodontite estágio III, grau B.

	Controle (n=30)	Periodontite (n=30)	Valor de P
Idade (anos) média±DP	37,96±8,29	38,48±8,72	0,904
Homens (n)	15(50%)	15(50%)	-
Mulheres (n)	15(50%)	15(50%)	-
PS (mm) média±DP	1,8±0,76	7,7±2,21	<0,001
NIC (mm) média±DP	1,9±0,80	9,0±2,88	<0,001
Perda óssea alveolar	Não	Sim	-

Tabela 4 Dados clínicos e demográficos da população de estudo

4.2 Painel de metilação de genes relacionados com a produção de citocinas

No grupo C, um perfil não metilado foi observado para a maioria dos genes avaliados. Apenas os genes *FOXP3*, *STAT5A*, *MALT1* e *LTB* apresentaram porcentagem de metilação na faixa de 50-80%. No grupo P, também foi observado um perfil não metilado para a maioria dos genes. No entanto, observamos uma diminuição dos níveis de metilação dos genes *FOXP3*, *STAT5A*, *MALT1* e *LTB* em comparação com o grupo C. Os genes *MALT1*, *LTB* e *STAT5A* apresentaram as maiores diferenças, com diminuição de aproximadamente 40-60% do nível de metilação. O gene *FOXP3* apresentou redução de 20% (**Figura 8 e Tabela 6**).

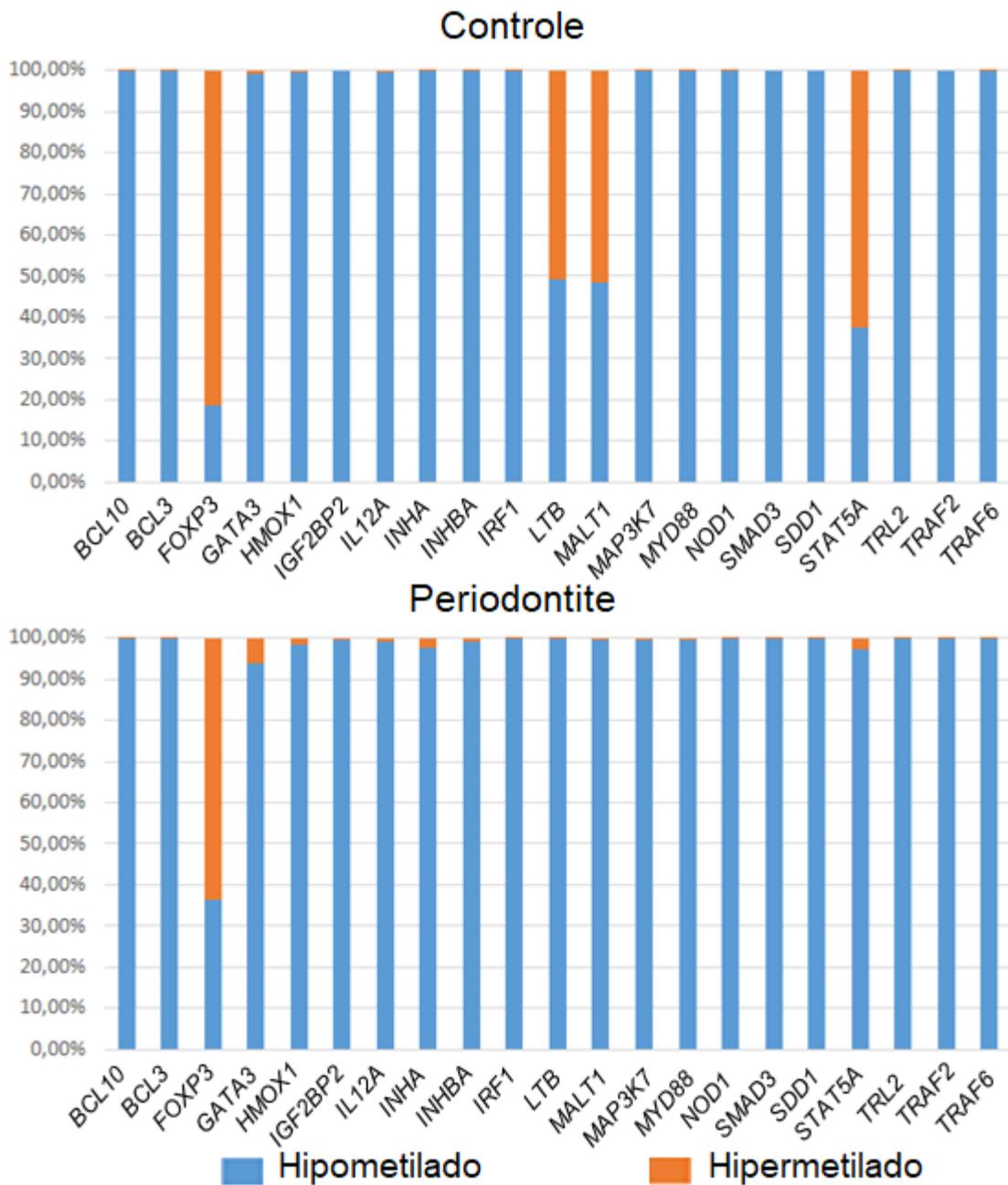


Figura 8 Perfil de metilação de DNA em genes relacionados a sinalização de produção de citocinas

Gene	Controle		Periodontite	
	Hipometilado	Hipermetilado	Hipometilado	Hipermetilado
<i>BCL10</i>	99,91%	0,09%	99,95%	0,05%
<i>BCL3</i>	99,98%	0,02%	99,99%	0,01%
<i>FOXP3</i>	18,67%	81,33%	36,46%	63,54%
<i>GATA3</i>	99,01%	0,99%	93,98%	6,02%
<i>HMOX1</i>	99,57%	0,43%	98,57%	1,43%
<i>IGF2BP2</i>	100,00%	0,00%	99,70%	0,30%
<i>IL12A</i>	99,67%	0,33%	99,08%	0,92%
<i>INHA</i>	99,80%	0,20%	97,48%	2,52%
<i>INHBA</i>	99,92%	0,08%	99,12%	0,88%
<i>IRF1</i>	99,97%	0,03%	99,91%	0,09%
<i>LTB</i>	49,38%	50,62%	99,95%	0,05%
<i>MALT1</i>	48,54%	51,46%	99,73%	0,27%
<i>MAP3K7</i>	99,79%	0,21%	99,52%	0,48%
<i>MYD88</i>	99,96%	0,04%	99,42%	0,58%
<i>NOD1</i>	99,90%	0,10%	99,96%	0,04%
<i>SMAD3</i>	100,00%	0,00%	99,96%	0,04%
<i>SOD1</i>	100,00%	0,00%	99,91%	0,09%
<i>STAT5A</i>	37,37%	62,63%	97,20%	2,80%
<i>TLR2</i>	99,88%	0,12%	99,88%	0,12%
<i>TRAF2</i>	100,00%	0,00%	99,86%	0,14%
<i>TRAF6</i>	99,90%	0,10%	99,87%	0,13%

Tabela 5 Percentuais de metilação dos genes avaliados no painel de metilação nos grupos controle e periodontite.

4.3 Padrão de metilação de *MALT1*, *LTB*, *STAT5A* e *FOXP3*

Para confirmar os dados obtidos no painel, avaliamos os genes que apresentaram perfis de metilação diferentes entre os grupos em um maior número de amostras. *MALT1*, *LTB* e *STAT5A* apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos (**Figura 9A, B, C**). O grupo C apresentou maiores porcentagens de metilação em comparação ao grupo P para esses genes. A mediana dos níveis de metilação apresentou diferença entre os grupos: 1,09% para *MALT1* ($p = 0,005$), 0,31% para *LTB* ($p = 0,004$) e 3,35% para *STAT5A* ($p = 0,015$). Nenhuma diferença significativa foi observada considerando o gene *FOXP3* ($p = 0,376$) (**Figura 9D**).

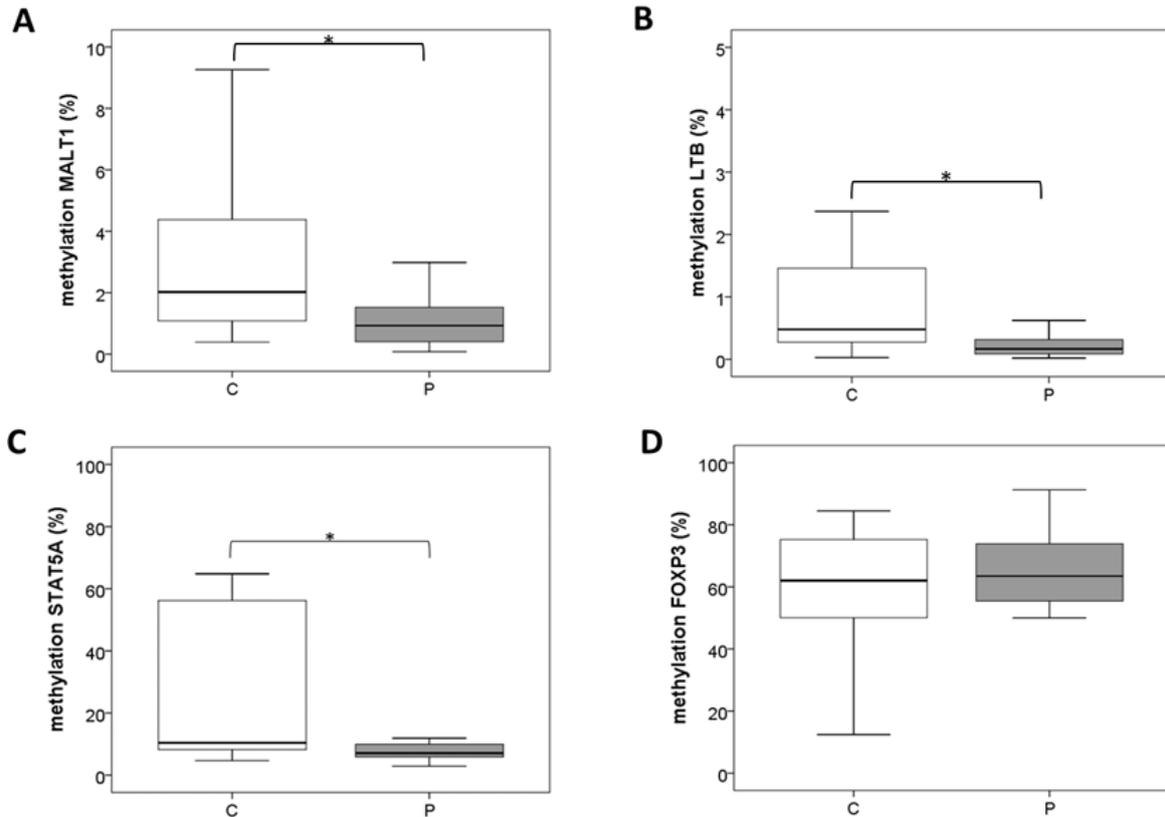


Figura 9 Perfil de metilação dos genes selecionados. Grupo controle (C), grupo periodontite (P). (*) representa as diferenças estatísticas. A ($p = 0,005$); B ($p = 0,004$); C ($p = 0,015$); D ($p = 0,367$).

Como os achados da literatura indicam que os genes *STAT5A* e *FOXP3* podem sofrer dimorfismo sexual na regulação de sua atividade molecular, foram realizadas análises considerando o sexo. Nesta análise, o gene *STAT5A* apresentou diferença significativa apenas entre os indivíduos do sexo masculino, sendo o grupo C com os maiores valores de metilação ($p = 0,024$) (**Figura 10A**). Considerando o gene *FOXP3*, também foi observada diferença significativa entre os homens dos grupos C e P, com o grupo P hipermetilado ($p = 0,037$). No grupo C, as mulheres apresentaram maior nível de metilação de *FOXP3* em comparação aos homens ($p = 0,002$) (**Figura 10B**).

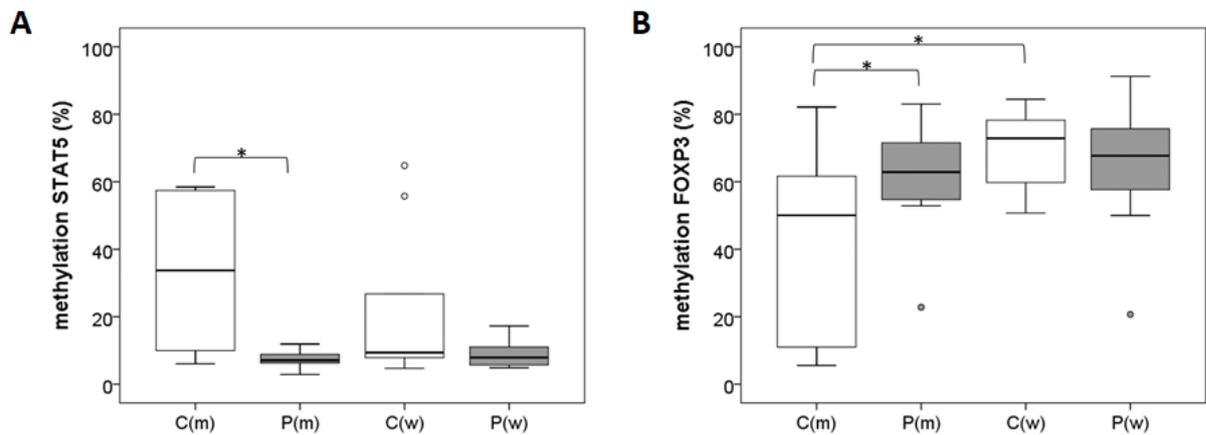


Figura 10 Perfil de porcentagem de metilação de *STAT5A* (A) e *FOXP3* (B) por sexo. C (m): grupo de homens controle; C (w): grupo de mulheres controle; P (m): grupo de homens com periodontite; P (w): grupo de mulheres com periodontite. (*) correspondem a diferenças estatísticas. A ($p = 0,024$); B (C (m) x P (m) $p = 0,037$; C (m) x C (w) $p = 0,002$).

4.4 Níveis de transcrição de *MALT1*, *LTB*, *STAT5A* e *FOXP3*

Nenhum dos genes avaliados apresentou diferença estatística na transcrição entre os grupos C e P (**Figura 11**).

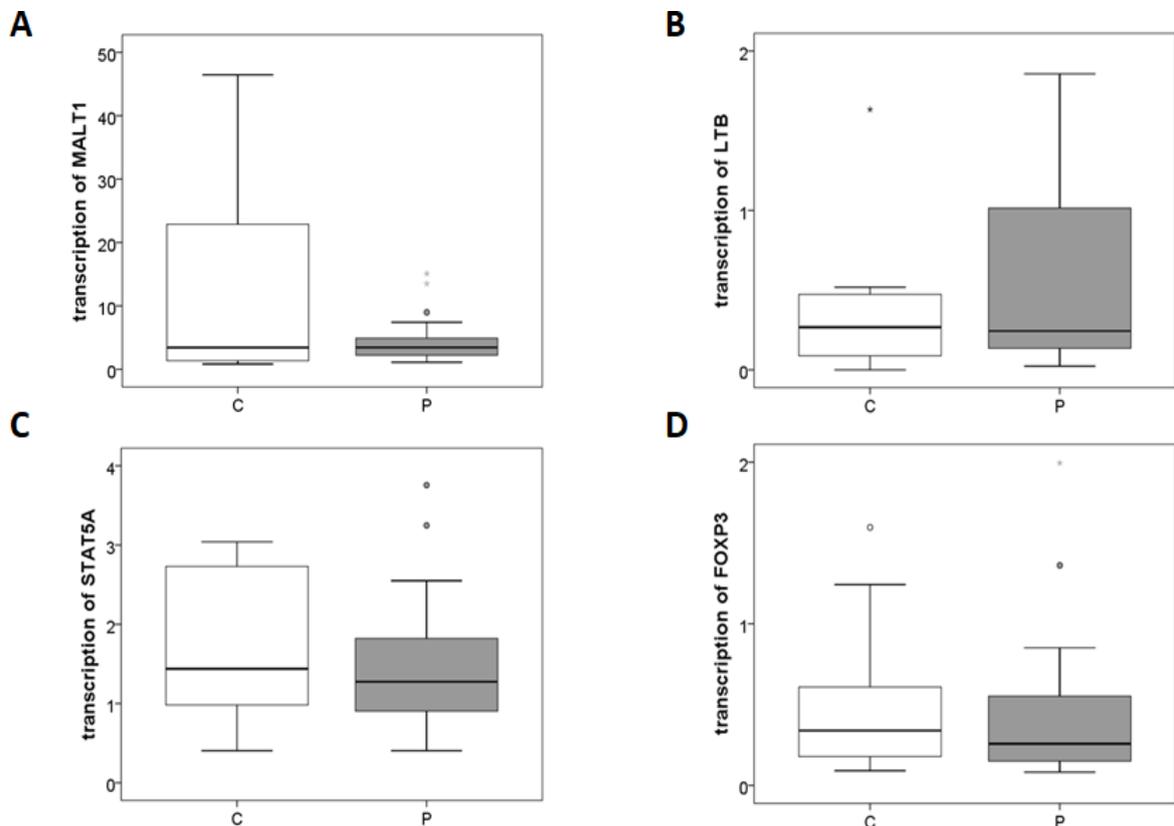


Figura 11 Transcrição de mRNA dos genes selecionados A) *MALT1*, B) *LTB*, C) *STAT5A*, D) *FOXP3*. C e barra branca correspondem ao grupo controle; P e barra cinza correspondem ao grupo periodontite. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos.

Realizamos a análise considerando o sexo também para os níveis de transcrição nos genes *STAT5A* e *FOXP3*. Para o gene *STAT5A*, não observamos diferenças entre os grupos (**Figura 12A**). Para o gene *FOXP3*, observamos diferenças entre os homens dos grupos C e P ($p = 0,037$), assim como entre homens e mulheres do grupo P ($p = 0,047$) (**Figura 12B**).

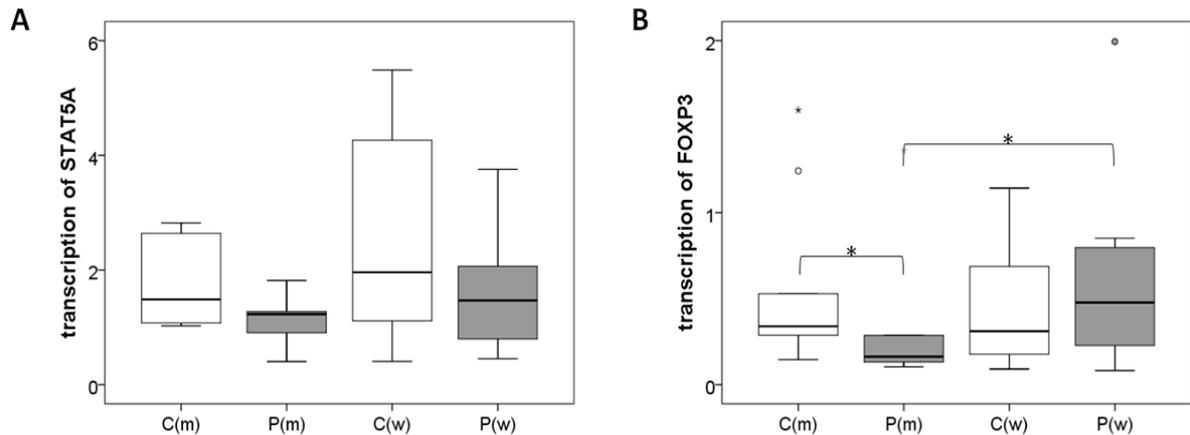


Figura 12 Níveis de transcrição de *STAT5A* (A) e *FOXP3* (B) considerando o sexo. C (m): grupo de homens controle; C (w): grupo de mulheres controle; P (m): grupo de homens com periodontite; P (w): grupo de mulheres com periodontite. (*) correspondem a diferenças estatísticas. B (C (m) x P (m) $p = 0,037$; P (m) x P (w) $p = 0,047$).

4.5 Correlação entre metilação e transcrição de *MALT1*, *LTB*, *STAT5A* e *FOXP3*.

Nenhum dos genes avaliados mostrou uma correlação estatisticamente significativa entre os percentuais de metilação e os níveis de transcrição (**Figura 13**).

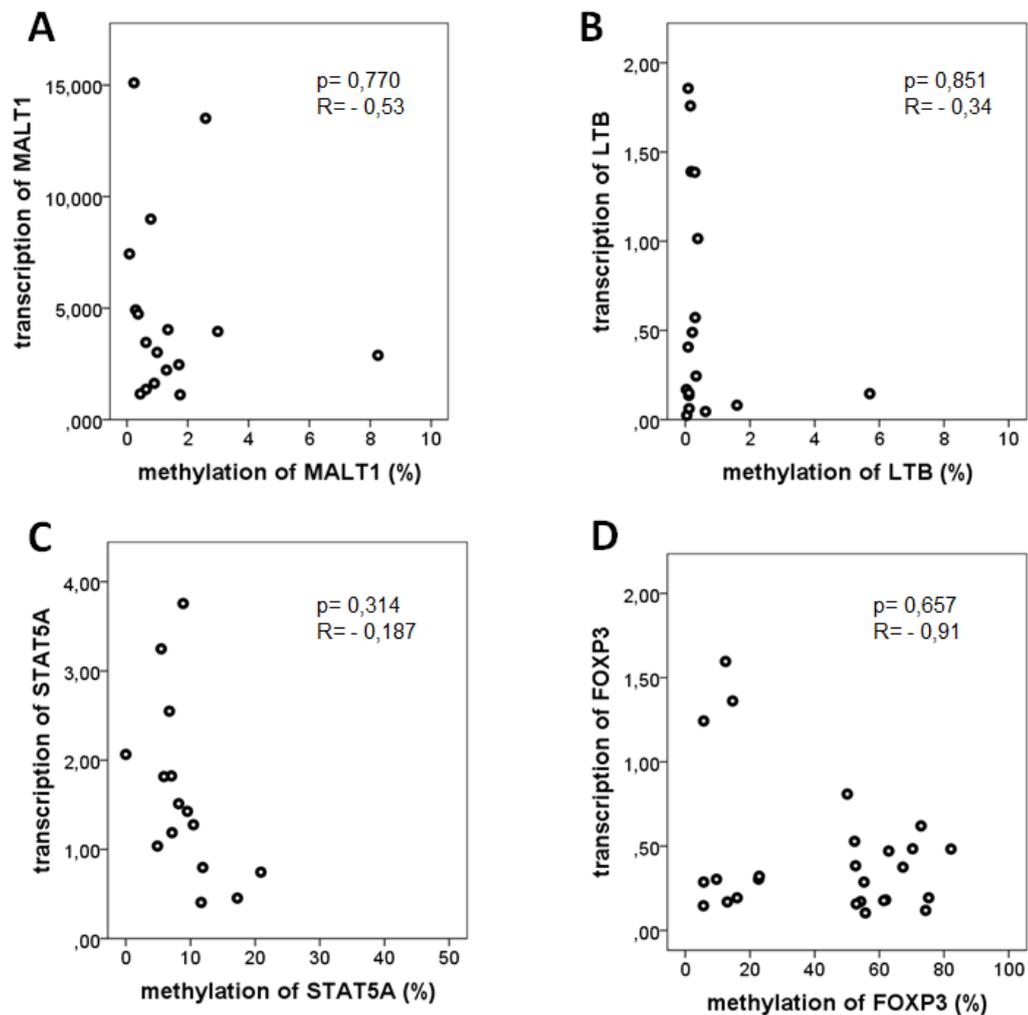


Figura 13 Correlação entre os valores de transcrição e metilação para cada gene avaliado. A) *MALT1*, B) *LTB*, C) *STAT5A* e D) *FOXP3*

4.6 Correlação da metilação e da transcrição com PS

Não observamos nenhuma correlação entre a porcentagem de metilação e a PS para todos os genes avaliados (dados não mostrados). A correlação entre os níveis de transcrição e a PS foi observada apenas para o gene *STAT5A* (**Figura 14**). No grupo de mulheres com periodontite, observou-se uma forte correlação negativa entre os níveis de transcrição de *STAT5A* e PS ($p = 0,030$; $R = -0,680$) (**Figura 14B**).

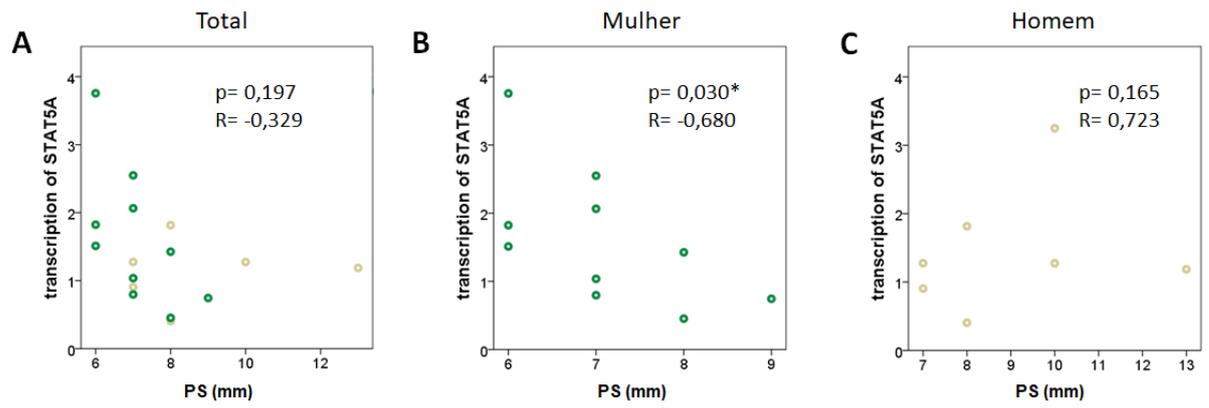


Figura 14 Correlação entre os níveis de transcrição de *STAT5A* e parâmetro clínico PS no grupo P.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, o padrão de metilação foi rastreado em 22 genes relacionados à produção de citocinas. Os genes *MALT1*, *LTB*, *STAT5A* e *FOXP3* apresentaram variação de pelo menos 20% no perfil de metilação entre os grupos C e P. Na etapa de validação com maior número de amostras, os genes *MALT1*, *LTB* e *STAT5A* apresentaram perfil não metilado no grupo P em comparação ao grupo C, mas sem diferenças entre os grupos na transcrição dos genes avaliados.

MALT1 é uma proteína de sinalização intracelular, expressa em vários tipos de células e medeia a sinalização de NF κ B, participando de funções como adesão e proliferação celular e estabilização de mRNA de IL-2, IL-6, e IL-12 (DEMEYER; STAAL; BEYAERT, 2016). A linfotoxina- β (LT β) é uma proteína ligante que estimula os membros do receptor de superfície da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral expresso na superfície (TNFRSF) de vários tipos de células, especialmente a linhagem de linfócitos (MACHO-FERNANDEZ et al., 2015). A regulação de *MALT1* e *LTB* pode ser muito importante nas condições inflamatórias, como na periodontite. A atividade de *MALT1* foi relatada como essencial nas respostas inflamatórias a infecções bacterianas e seus produtos, e sua deficiência está relacionada à degradação óssea patológica (MONAJEMI et al., 2019; REBEAUD et al., 2008). Em relação ao *LTB*, uma rápida suprarregulação foi observada em resposta a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em modelo animal (GARLET, 2010). Além disso, foi observado por Gupta et al. (2020) uma expressão maior de *LTB* em pacientes com periodontite sistemicamente saudáveis quando comparados aos pacientes com periodontite e bronquiectasia.

Neste estudo, os genes *MALT1* e *LTB* apresentaram diferenças estatísticas no perfil de metilação entre os grupos, mas esse resultado deve ser considerado com cautela. Isso porque a diferença nos níveis de metilação entre os grupos estudados foi muito pequena, não ultrapassando 2%. Essa pequena diferença pode não ter influência biológica e não afetar o processo de transcrição gênica, o que pode ter influenciado para não haver diferenças na transcrição. Na literatura, a metilação e a transcrição de *MALT1* e *LTB* ainda são pouco exploradas na periodontite.

O *STAT5A* é um fator de transcrição expresso em vários tipos celulares e participa da via de sinalização JAK/STAT, uma das vias mais importantes e rápidas na condução de informações recebidas na superfície da membrana e translocadas

para o núcleo (JENKS et al., 2013; KANAI et al., 2014; WU; XUE, 2008). Como resultado, estimula a expressão de várias citocinas, como IL-2, IL-4, IL-7, IL -9, IL-15, IL-21 e IL-6, bem como a expressão de moléculas que participam do fenótipo do desenvolvimento celular (BANERJEE et al., 2017; KAGAMI et al., 2001). STAT5 é também envolvido no processo de diferenciação de células T. Participa na diferenciação Th1 por meio da ligação de IL-12 e em Th2 por IL-4 e Treg por IL-2, e STAT5A está mais intimamente relacionado a esses últimos subtipos (OWEN; FARRAR, 2017) .

Neste estudo, foi visto que os indivíduos com periodontite apresentaram uma menor porcentagem de metilação no gene *STAT5A* comparados aos indivíduos controle, o que também foi evidente na análise considerando apenas os homens. A presença de um perfil hipometilado do gene *STAT5A* no grupo P poderia indicar que o gene estaria mais ativo e com maior transcrição. Estudos mostram que a atividade de STAT5A influencia na proporção da população celular Th2 e Treg (TAKATORI et al., 2005). A diferenciação das células Th2 é dependente da via de sinalização IL-2/STAT5 e nas células Treg, o STAT5A participa do recrutamento de TETs para o processo de desmetilação de *FOXP3* e aumento da expressão dessa molécula (GADDIS; MICHALEK; KATZ, 2011). No entanto, não foi observada diferenças na análise da transcrição de *STAT5A* entre os grupos C e P.

Possivelmente, outros mecanismos reguladores de *STAT5A* podem estar atuando e influenciando os níveis dos transcritos. A metilação do DNA é um fator molecular importante na regulação da expressão gênica, mas não é o único. A expressão gênica pode ser regulada por outros mecanismos epigenéticos como a modificação de histonas, miRNA e RNA não codificantes, além da modificação da expressão pela presença de polimorfismos genéticos na periodontite (MARTÍNEZ-GARCÍA; HERNÁNDEZ-LEMUS, 2021).

Na periodontite, estudos prévios avaliaram *STAT5A* nos tecidos gengivais e verificaram hipometilação no gene (AZEVEDO et al., 2020), maior expressão de mRNA (PARACHURU et al., 2018) e maior presença da molécula (WANG et al., 2019). A literatura é escassa sobre a avaliação de *STAT5A* na periodontite ou doenças periodontais em humanos, mas existem alguns estudos em animais que avaliaram a sua atividade na patogênese da doença. Aquino et al.(2009) observaram diferenças na ativação de STAT5 em diferentes modelos experimentais de periodontite. Foi observada a ativação de STAT5 no modelo de periodontite induzido por ligadura e não

no modelo de indução por LPS de *P.gingivalis*; o que sugere uma maior complexidade na ativação desse gene. Além disso, estímulos bacterianos provenientes de *P.gingivalis* parecem não possuir efeitos negativos na atividade de STAT5A (KHALAF; DEMIREL; BENGTSSON, 2013)

Considerando o parâmetro clínico de PS, foi observada uma correlação negativa entre PS e a transcrição de *STAT5A* em mulheres. Tal achado sugere que mecanismos relacionados à progressão da periodontite podem regular a transcrição de *STAT5A* nesses indivíduos. Isso poderia causar modulação de respostas que seriam prejudiciais para o hospedeiro. Um efeito negativo na inibição de transcrição de *STAT5A* pode estar relacionado com a diminuição de uma resposta imune eficiente e regulatória, o que pode resultar em perdas teciduais e bolsas clínicas mais profundas nas pacientes do grupo feminino. Esse achado no grupo de pacientes mulheres pode estar relacionado a diferença de atividade do *STAT5A* entre os sexos.

O dimorfismo sexual é visto na expressão e atividade de *STAT5* em algumas doenças, como doenças vasculares (SEHGAL et al., 2015). Esse viés está relacionado à interação de receptores com hormônios sexuais e fatores de crescimento. Nestes casos, a transdução de sinais hormonais passa pela via JAK / STAT e pode gerar diferentes respostas a diferentes hormônios. As diferenças específicas que ocorrem nos mecanismos celulares estimulados por hormônios masculinos ou femininos não estão bem definidas (DAVEY; WILKINS; WAXMAN, 1999; SEHGAL et al., 2015).

Outro gene avaliado neste estudo foi o gene *FOXP3*. *FOXP3* é um fator de transcrição que está intrinsecamente ligado à atividade das células Treg. A expressão desse gene caracteriza esse subtipo celular e induz a expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-10, TGF- β e inibe as citocinas pró-inflamatórias IL-2 e IL-4 (HOLMES; GAO; SU, 2011; RUDENSKY, 2011). No presente estudo, não foram observadas diferenças no perfil de metilação de *FOXP3* entre os grupos C e P. É importante ressaltar que *FOXP3* está localizado no cromossomo X e tal fato poderia influenciar no perfil de metilação presente nos grupos. Hall et al. (2014) avaliaram diferenças no perfil de metilação do cromossomo X entre os sexos e mostraram que indivíduos do sexo feminino possuem um perfil hipermetilado de genes localizados nesse cromossomo comparado aos indivíduos do sexo 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 (TUKIAINEN et al., 2017). Sendo assim, uma análise considerando o sexo foi realizada para evitar um possível viés (NIE et al., 2015; VOSKUHLL; SAWALHA; ITOH, 2018).

Nas análises entre os sexos, constatou-se que o perfil de metilação se distribuiu de forma heterogênea entre os grupos. Homens com periodontite apresentaram maior nível de metilação em comparação ao grupo C, além de apresentarem níveis mais baixos de transcritos. Voskuhl, Sawalha e Itoh (2018) verificaram a influência do viés sexual na metilação do *FOXP3* e seu papel em doenças autoimunes em ratos transgênicos. Foi visto que a metilação de DNA nesse gene era mais prejudicial aos ratos XY e que existe um papel negativo do *imprinting* genômico dos ratos XY afetados e sua prole.

Um perfil hipermetilado e uma menor transcrição em indivíduos homens com periodontite podem indicar que o papel regulador das células Treg está prejudicado na periodontite. Com isso, a inibição das atividades pró-inflamatórias poderia estar ineficiente e a diferenciação das células *FOXP3*⁺ prejudicada. Esse resultado é consistente com dados da literatura sobre a diminuição da proporção de células Treg em lesões periodontais mais avançadas (CARDOSO et al., 2008; NAKAJIMA et al., 2005; PARACHURU et al., 2014). As células Treg *CD4*⁺ estão relacionadas à produção de citocinas anti-inflamatórias e ao controle de processos inflamatórios, enquanto as células Treg *CD8*⁺ estão relacionadas à supressão da destruição óssea e à indução da formação óssea alveolar (HAN et al., 2018; SABARISH; RAO; LAVU, 2016). A redução dos níveis de *FOXP3* em pacientes do grupo P pode indicar redução da atividade desses fenótipos celulares. O ganho de metilação no promotor do gene avaliado pode indicar que há uma modulação do controle da expressão desse gene quando o processo inflamatório é estabelecido.

O padrão de metilação do gene *FOXP3* não foi previamente estudado na periodontite, mas alguns trabalhos demonstraram a relação da alteração da metilação do gene com algumas doenças. Zhu et al.(2019) observaram que a hipermetilação do gene *FOXP3* estava associado a um maior risco na síndrome coronariana aguda. Nesse trabalho observaram que metilação do *FOXP3* estava relacionada a aterosclerose e era inversamente proporcional as porcentagens de TGF- β e IL-10. Além disso, foi observado um impacto negativo da metilação de *FOXP3* em doenças como asma, doença obstrutiva pulmonar crônica (DOPC), hipertensão e colangite biliar primária (DU et al., 2019; PRUNICKI et al., 2021; ZHU et al., 2020). Na cavidade

oral, a metilação e transcrição do gene *FOXP3* foi estudada por Campos et al. (2015) em granulomas e cistos periapicais. O trabalho observou uma hipermetilação nas lesões comparadas ao controle, e uma correlação entre a hipermetilação e os baixos valores de transcrição.

As diferenças descritas na literatura sobre os perfis de resposta entre homens e mulheres (GROVER et al., 2016; VALERIO; KIRKWOOD, 2018) podem ter uma base epigenética que pode estar contribuindo em certos desfechos. Essas diferenças entre os sexos já foram descritas sobre as particularidades hormonais com influência na inflamação e metabolismo ósseo (SHIAU; AICHELMANN-REIDY; REYNOLDS, 2014). Além disso, existem indícios de diferenças entre os sexos na atividade celular inflamatória frente ao desafio bacteriano periodontopatogênico (VALERIO; KIRKWOOD, 2018). Ainda assim, persiste uma lacuna no entendimento sobre os processos inflamatórios e regulatórios individuais e seu impacto na doença. Esse trabalho coloca luz sobre possíveis impactos epigenéticos específicos, nos genes *FOXP3* e *STAT5A*, em homens e mulheres com periodontite. Apesar de apresentarem um mesmo resultado clínico da periodontite; como a perda óssea, por exemplo, os mecanismos inflamatórios que desencadearam a doença podem ter pequenas particularidades entre homens e mulheres, e servirem como base para estudos de tratamentos futuros.

Esses achados em conjunto sugerem que alterações nos perfis de metilação de *STAT5A* e *FOXP3* são mecanismos epigenéticos presentes nos tecidos gengivais de indivíduos com periodontite moderada, com particularidades considerando o sexo. Mais estudos são necessários para esclarecer os efeitos da epigenética nas vias celulares nos processos inflamatórios e contribuir para um melhor entendimento da patogênese da periodontite.

REFERÊNCIAS

ABLE, Ashley A.; BURRELL, Jasmine A.; STEPHENS, Jacqueline M. STAT5-Interacting Proteins: A Synopsis of Proteins that Regulate STAT5 Activity. **Biology**, [S. l.], v. 6, n. 1, 2017. DOI: 10.3390/biology6010020..

ALBANDAR, Jasim M. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. **Periodontology 2000**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 177–206, 2002. DOI: 10.1034/j.1600-0757.2002.290109.x.

ALVAREZ, Carla; SULIMAN, Salwa; ALMARHOUMI, Rawan; VEGA, Maria Elena; ROJAS, Carolina; MONASTERIO, Gustavo; GALINDO, Mario; VERNAL, Rolando; KANTARCI, Alpdogan. Regulatory T cell phenotype and anti-osteoclastogenic function in experimental periodontitis. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-76038-w.

AN, Kopitar; IHAN, Hren; IHAN, A. Commensal oral bacteria antigens prime human dendritic cells to induce Th1 , Th2 or T reg differentiation. **Oral microbiology and immunology**, [S. l.], n. 8, p. 1–5, 2006.

ANDIA, Denise C.; PLANELLO, Aline C.; PORTINHO, Danielle; DA SILVA, Rodrigo A.; SALMON, Cristiane R.; SALLUM, Enilson A.; JUNIOR, Francisco H. Nociti; DE SOUZA, Ana P. DNA methylation analysis of SOCS1, SOCS3, and LINE-1 in microdissected gingival tissue. **Clinical Oral Investigations**, [S. l.], v. 19, n. 9, p. 2337–2344, 2015. DOI: 10.1007/s00784-015-1460-1.

AQUINO, Sabrina Garcia De; MANZOLLI LEITE, Fabio Renato; STACH-MACHADO, Dagmar Ruth; FRANCISCO DA SILVA, Juliete Aparecida; SPOLIDORIO, Luís Carlos; ROSSA, Carlos. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. **Life Sciences**, [S. l.], v. 84, n. 21–22, p. 745–754, 2009. DOI: 10.1016/j.lfs.2009.03.001.

ARAUJO-PIRES, Ana Claudia et al. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. **Journal of applied oral science : revista FOB**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 336–46, 2014. DOI: 10.1590/1678-775720140140.

ARMITAGE, Gary C. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. **Annals of Periodontology**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1–6, 1999. DOI: 10.1902/annals.1999.4.1.1.

AZEVEDO, Andrea Mara; CARVALHO ROCHA, Luiz Paulo; DE FARIA AMORMINO, Simone Angélica; CAVALIERI GOMES, Carolina; ORNELAS DUTRA, Walderez; SANTIAGO GOMEZ, Ricardo; DA COSTA, José Eustáquio; ROCHA MOREIRA, Paula. DNA methylation profile of genes related to immune response in generalized periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, [S. l.], v. 55, n. 3, p. 426–431, 2020. DOI: 10.1111/jre.12726.

BABON, Jeffrey J.; NICOLA, Nicos A. The biology and mechanism of action of

suppressor of cytokine signaling 3. **Growth Factors**, [S. I.], v. 30, n. 4, p. 207–219, 2012. DOI: 10.3109/08977194.2012.687375.

BAIMA, G.; ROMANDINI, M.; CITTERIO, F.; ROMANO, F.; AIMETTI, M. Periodontitis and Accelerated Biological Aging: A Geroscience Approach. **Journal of Dental Research**, [S. I.], p. 002203452110379, 2021. DOI: 10.1177/00220345211037977.

BANERJEE, Shubhasree; BIEHL, Ann; GADINA, Massimo; HASNI, Sarfaraz; SCHWARTZ, Daniella M. JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. **Drugs**, [S. I.], v. 77, n. 5, p. 521–546, 2017. DOI: 10.1007/s40265-017-0701-9.

BAPTISTA, N. B. B.; PORTINHO, D.; CASARIN, R. C. V. C. V; VALE, H. F. F.; CASATI, M. Z. Z.; DE SOUZA, A. P. P.; ANDIA, D. C. C. DNA methylation levels of SOCS1 and LINE-1 in oral epithelial cells from aggressive periodontitis patients. **Archives of Oral Biology**, [S. I.], v. 59, n. 7, p. 670–678, 2014. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2014.03.015.

BARROS, S. P.; OFFENBACHER, S. Epigenetics: Connecting Environment and Genotype to Phenotype and Disease. **Journal of Dental Research**, [S. I.], v. 88, n. 5, p. 400–408, 2009. DOI: 10.1177/0022034509335868.

BARROS, Silvana P.; OFFENBACHER, Steven. Modifiable risk factors in periodontal disease: Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response Barros & Offenbacher Epigenetics in periodontal disease. **Periodontology 2000**, [S. I.], v. 64, n. 1, p. 95–110, 2014. DOI: 10.1111/prd.12000.

BAUER, Judith; NAMINENI, Sukumar; REISINGER, Florian; ZÖLLER, Jessica; YUAN, Detian; HEIKENWÄLDER, Mathias. Lymphotoxin, NF- κ B, and Cancer: The Dark Side of Cytokines. **Digestive Diseases**, [S. I.], v. 30, n. 5, p. 453–468, 2012. DOI: 10.1159/000341690.

BAYARSAIHAN, Dashzeveg. Epigenetic mechanisms involved in modulation of inflammatory diseases. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [S. I.], v. 19, n. 4, p. 263–269, 2016. DOI: 10.1097/MCO.0000000000000281.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. **Journal of Periodontal Research**, [S. I.], v. 28, n. 7, p. 500–510, 1993. DOI: 10.1111/j.1600-0765.1993.tb02113.x.

BITTNER-EDDY, Peter D.; FISCHER, Lori A.; COSTALONGA, Massimo. Transient Expression of IL-17A in Foxp3 Fate-Tracked Cells in Porphyromonas gingivalis-Mediated Oral Dysbiosis. **Frontiers in Immunology**, [S. I.], v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00677.

BORNANCIN, Frédéric et al. Deficiency of MALT1 Paracaspase Activity Results in Unbalanced Regulatory and Effector T and B Cell Responses Leading to Multiorgan Inflammation. **The Journal of Immunology**, [S. I.], v. 194, n. 8, p. 3723–3734, 2015. DOI: 10.4049/jimmunol.1402254.

BOSTANCI, Nagihan; BELIBASAKIS, Georgios N. Porphyromonas gingivalis: An invasive and evasive opportunistic oral pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, [S. I.],

v. 333, n. 1, p. 1–9, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02579.x.

BOUKORTT, Kawther Nourelhouda et al. Association analysis of the IL-1 gene cluster polymorphisms with aggressive and chronic periodontitis in the Algerian population. **Archives of Oral Biology**, [S. l.], v. 60, n. 10, p. 1463–1470, 2015. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2015.06.018.

BRÜSTLE, A.; BRENNER, D.; KNOBBE-THOMSEN, C. B.; COX, M.; LANG, P. A.; LANG, K. S.; MAK, T. W. MALT1 is an intrinsic regulator of regulatory T cells. **Cell death and differentiation**, [S. l.], v. 24, n. 7, p. 1214–1223, 2017. DOI: 10.1038/cdd.2015.104.

CAMPOS, Kelma; FRANSCISCONI, Carolina F.; OKEHIE, Valerie; DE SOUZA, Letícia C.; TROMBONE, Ana Paula F.; LETRA, Ariadne; GARLET, Gustavo P.; GOMEZ, Ricardo S.; SILVA, Renato M. FOXP3 DNA Methylation Levels as a Potential Biomarker in the Development of Periapical Lesions. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 212–218, 2015. DOI: 10.1016/j.joen.2014.10.003.

CARDOSO, Cristina Ribeiro; GARLET, Gustavo Pompermaier; MOREIRA, Ana Paula; JÚNIOR, Wálter Martins; ROSSI, Marcos Antônio; SILVA, João Santana. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. **Journal of leukocyte biology**, [S. l.], v. 84, n. 1, p. 311–318, 2008. DOI: 10.1189/jlb.0108014.

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

CASANOVA, L.; HUGHES, F. J.; PRESRAW, P. M. Diabetes and periodontal disease: A two-way relationship. **British Dental Journal**, [S. l.], v. 217, n. 8, p. 433–437, 2014. DOI: 10.1038/sj.bdj.2014.907.

CAVALLI, Giacomo; HEARD, Edith. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. **Nature**, [S. l.], v. 571, n. 7766, p. 489–499, 2019. DOI: 10.1038/s41586-019-1411-0.

CHAFFEE, Benjamin W.; COUCH, Elizabeth T.; VORA, Manali V.; HOLLIDAY, Richard S. **Oral and periodontal implications of tobacco and nicotine products** *Periodontology* 2000 John Wiley and Sons Inc, , 2021. DOI: 10.1111/prd.12395.

CHAPPLE, Iain L. C. et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of periodontology**, [S. l.], v. 89, p. S74–S84, 2018. DOI: 10.1002/JPER.17-0719.

CHENG, Wan Chien; HUGHES, Francis J.; TAAMS, Leonie S. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, [S. l.], v. 41, n. 6, p. 541–549, 2014. DOI: 10.1111/jcpe.12238.

CHOI, J.; LEE, S. Y.; KIM, K.; CHOI, B. K. Identification of immunoreactive epitopes of the Porphyromonas gingivalis heat shock protein in periodontitis and atherosclerosis.

Journal of Periodontal Research, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 240–245, 2011. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2010.01339.x.

CLARK, Daniel; KOTRONIA, Eftychia; RAMSAY, Sheena E. **Frailty, aging, and periodontal disease: Basic biologic considerations***Periodontology 2000* John Wiley and Sons Inc, , 2021. DOI: 10.1111/prd.12380.

DAI, Xuezhhi; CHEN, Yuhong; DI, Lie; PODD, Andrew; LI, Geqiang; BUNTING, Kevin D.; HENNIGHAUSEN, Lothar; WEN, Renren; WANG, Demin. Stat5 is essential for early B cell development but not for B cell maturation and function. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 179, n. 2, p. 1068–79, 2007.

DAVEY, Helen W.; WILKINS, Richard J.; WAXMAN, David J. STAT5 Signaling in Sexually Dimorphic Gene Expression and Growth Patterns. **The American Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 959–965, 1999. DOI: 10.1086/302599.

DE CAMARGO PEREIRA, Gláucia et al. Porphyromonas gingivalis LPS stimulation downregulates DNMT1, DNMT3a, and JMJD3 gene expression levels in human HaCaT keratinocytes. **Clinical Oral Investigations**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 1279–1285, 2013. DOI: 10.1007/s00784-012-0816-z.

DE FARIA AMORMINO, Simone Angélica Angélica et al. Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. **Human Immunology**, [S. l.], v. 74, n. 9, p. 1231–1236, 2013. DOI: 10.1016/j.humimm.2013.04.037.

DE VRIES, Teun J.; ANDREOTTA, Stefano; LOOS, Bruno G.; NICU, Elena A. Genes Critical for Developing Periodontitis: Lessons from Mouse Models. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 8, p. 1395, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01395.

DEMEYER, Annelies; STAAL, Jens; BEYAERT, Rudi. Targeting MALT1 Proteolytic Activity in Immunity, Inflammation and Disease: Good or Bad? **Trends in Molecular Medicine**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 135–150, 2016. DOI: 10.1016/J.MOLMED.2015.12.004.

DEVAUD, Christel; DARCY, Phillip K.; KERSHAW, Michael H. Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [S. l.], v. 63, n. 9, p. 869–876, 2014. DOI: 10.1007/s00262-014-1581-4.

DI BENEDETTO, Adriana; GIGANTE, Isabella; COLUCCI, Silvia; GRANO, Maria. **Periodontal disease: Linking the primary inflammation to bone loss***Clinical and Developmental Immunology*Hindawi Limited, , 2013. DOI: 10.1155/2013/503754.

DING, Cheng; JI, Xiaowei; CHEN, Xing; XU, Yan; ZHONG, Liangjun. *TNF- α* gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies. **Journal of Clinical Periodontology**, [S. l.], v. 41, n. 8, p. 748–759, 2014. DOI: 10.1111/jcpe.12279.

DU, Xizi et al. Variable DNA methylation of aging-related genes is associated with male COPD. **Respiratory Research**, [S. l.], v. 20, n. 1, 2019. DOI: 10.1186/s12931-019-1215-7.

DUTZAN, Nicolas; ABUSLEME, Loreto. T Helper 17 Cells as Pathogenic Drivers of Periodontitis. *In*: [s.l.] : Springer, 2019. v. 1197p. 107–117. DOI: 10.1007/978-3-030-

28524-1_9.

DUTZAN, Nicolás; GAMONAL, Jorge; SILVA, Augusto; SANZ, Mariano; VERNAL, Rolando. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor- β during the progression of chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 396–403, 2009. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2009.01390.x.

FIGUEREDO, C. M.; LIRA-JUNIOR, R.; LOVE, R. M. T and B Cells in Periodontal Disease: New Functions in A Complex Scenario. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 16, p. 3949, 2019. DOI: 10.3390/ijms20163949.

FISCHER, Klaus-Dieter; TEDFORD, Kerry; WIRTH, Thomas. New roles for Bcl10 in B-cell development and LPS response. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 113–116, 2004. DOI: 10.1016/j.it.2003.12.007.

G. CATON, Jack et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. **Journal of Clinical Periodontology**, [S. l.], v. 45, n. March, p. S1–S8, 2018. DOI: 10.1111/jcpe.12935.

GADDIS, Dalia E.; MICHALEK, Suzanne M.; KATZ, Jannet. TLR4 Signaling via MyD88 and TRIF Differentially Shape the CD4 + T Cell Response to Porphyromonas gingivalis Hemagglutinin B . **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 186, n. 10, p. 5772–5783, 2011. DOI: 10.4049/jimmunol.1003192.

GARLET, G. P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **Journal of dental research**, [S. l.], v. 89, n. 12, p. 1349–63, 2010. DOI: 10.1177/0022034510376402.

GENCO, Robert J.; SANZ, Mariano. **Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview** *Periodontology 2000* Blackwell Munksgaard, , 2020. DOI: 10.1111/prd.12344.

GOMEZ, Ricardo Santiago; DUTRA, Walderez Ornelas; MOREIRA, Paula Rocha. Epigenetics and periodontal disease: Future perspectives. **Inflammation Research**, [S. l.], v. 58, n. 10, p. 625–629, 2009. DOI: 10.1007/s00011-009-0041-7.

GOPISETTY, G.; RAMACHANDRAN, K.; SINGAL, R. DNA methylation and apoptosis. **Molecular Immunology**, [S. l.], v. 43, n. 11, p. 1729–1740, 2006. DOI: 10.1016/j.molimm.2005.11.010.

GROVER, Vishakha; JAIN, Ashish; KAPOOR, Anoop; MALHOTRA, Ranjan; SINGH CHAHAL, Gurparkash. The Gender Bender effect in Periodontal Immune Response. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 12–20, 2016. DOI: 10.2174/1871530316666160107111301.

GUPTA, Abhaya; SINGH, Neetu; KUMAR, Anil; VERMA, Umesh Pratap; VERMA, Ajay Kumar; SHYAM, Hari; LAL, Nand; KANT, Surya; KUMARI, Ankur. Differential expression of inflammatory responsive genes between chronic periodontitis and periodontally affected bronchiectasis patients. **Molecular Biology Research**

Communications, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 169–172, 2020. DOI: 10.22099/mbrc.2020.37397.1508.

HACHMANN, Janna; SALVESEN, Guy S. The Paracaspase MALT1. **Biochimie**, [S. l.], v. 122, p. 324–338, 2016. DOI: 10.1016/j.biochi.2015.09.018.

HAJISHENGALLIS, G.; SAHINGUR, S. E. Novel Inflammatory Pathways in Periodontitis. **Advances in Dental Research**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 23–29, 2014. DOI: 10.1177/0022034514526240.

HAN, Y. K.; JIN, Y.; MIAO, Y. B.; SHI, T.; LIN, X. P. CD8+ Foxp3+ T Cells Affect Alveolar Bone Homeostasis via Modulating Tregs/Th17 During Induced Periodontitis: an Adoptive Transfer Experiment. **Inflammation**, [S. l.], p. 1–13, 2018. DOI: 10.1007/s10753-018-0822-7.

HANS, Mayank; HANS, Veenu Madaan. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. **Journal of Oral Science**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 263–271, 2011. DOI: 10.2334/josnurd.53.263.

HERNÁNDEZ, M. et al. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. **Journal of dental research**, [S. l.], v. 90, n. 10, p. 1164–1170, 2011. DOI: 10.1177/0022034511401405.

HOLMES, Derek; GAO, Jianmei; SU, Lishan. Foxp3 inhibits HDAC1 activity to modulate gene expression in human T cells. **Virology**, [S. l.], v. 421, n. 1, p. 12–8, 2011. DOI: 10.1016/j.virol.2011.09.002.

ISHIDA, Kohei; KOBAYASHI, Tetsuo; ITO, Satoshi; KOMATSU, Yasutaka; YOKOYAMA, Tomoko; OKADA, Moe; ABE, Asami; MURASAWA, Akira; YOSHIE, Hiromasa. Interleukin-6 Gene Promoter Methylation in Rheumatoid Arthritis and Chronic Periodontitis. **Journal of Periodontology**, [S. l.], v. 83, n. 7, p. 917–925, 2012. DOI: 10.1902/jop.2011.110356.

JAWORSKI, Maike; THOME, Margot. The paracaspase MALT1: biological function and potential for therapeutic inhibition. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, [S. l.], v. 73, n. 3, p. 459–73, 2016. DOI: 10.1007/s00018-015-2059-z.

JENKS, Jennifer A. et al. Differentiating the roles of STAT5B and STAT5A in human CD4+ T cells. **Clinical Immunology**, [S. l.], v. 148, n. 2, p. 227–236, 2013. DOI: 10.1016/j.clim.2013.04.014.

JEONG, Euikyong; KIM, Koanhoi; KIM, June Hong; CHA, Gil Sun; KIM, Sung-jo; KANG, Ho Sung; CHOI, Jeomil. Porphyromonas gingivalis HSP60 peptides have distinct roles in the development of atherosclerosis. **Molecular Immunology**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 489–496, 2015. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.10.004.

JEPSEN, Søren et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of periodontology**, [S. l.], v. 89, p. S237–S248, 2018. DOI: 10.1002/JPER.17-0733.

JURDZIŃSKI, Krzysztof T.; POTEMPA, Jan; GRABIEC, Aleksander M. **Epigenetic regulation of inflammation in periodontitis: cellular mechanisms and therapeutic potential***Clinical Epigenetics*BioMed Central Ltd, , 2020. DOI: 10.1186/s13148-020-00982-7.

KAGAMI, S. et al. Stat5a regulates T helper cell differentiation by several distinct mechanisms. **Blood**, [S. l.], v. 97, n. 8, p. 2358–65, 2001.

KANAI, Takahiro; SEKI, Scott; JENKS, Jennifer A.; KOHLI, Arunima; KAWLI, Trupti; MARTIN, Dorrelyn Patacsil; SNYDER, Michael; BACCHETTA, Rosa; NADEAU, Kari C. Identification of STAT5A and STAT5B target genes in human T cells. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0086790.

KANTRONG, Nutthapong; TO, Thao T.; DARVEAU, Richard P. Gingival Epithelial Cell Recognition of Lipopolysaccharide. *In: Advances in experimental medicine and biology*. [s.l.: s.n.]. v. 1197p. 55–67. DOI: 10.1007/978-3-030-28524-1_5.

KARTHIKEYAN, B.; TALWAR; ARUN, K. V; KALAIVANI, S. Evaluation of transcription factor that regulates T helper 17 and regulatory T cells function in periodontal health and disease. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. S672–S676, 2015. DOI: 10.4103/0975-7406.163602.

KHALAF, Hazem; DEMIREL, Isak; BENGTSSON, Torbjörn. Suppression of inflammatory gene expression in T cells by *Porphyromonas gingivalis* is mediated by targeting MAPK signaling. **Cellular and Molecular Immunology**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 413–422, 2013. DOI: 10.1038/cmi.2013.23.

KINANE, Denis F.; STATHOPOULOU, Panagiota G.; PAPAPANOU, Panos N. Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, [S. l.], v. 3, p. 17038, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.38.

KORNFELD, Jan-Wilhelm et al. The different functions of Stat5 and chromatin alteration through Stat5 proteins. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, [S. l.], v. 13, p. 6237–54, 2008. DOI: 10.2741/3151.

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. **Journal of Immunology**, [S. l.], v. 182, p. 259–273, 2009. DOI: 182/1/259 [pii].

LAL, Girdhari; YIN, Na; XU, Jiangnan; LIN, Marvin; BERND, Schroppe; MARIE, Isabelle; LEVY, David E.; BROMBERG, Jonathan S. Function. [S. l.], v. 11, n. 2, p. 203–214, 2012. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2010.03389.x.Distinct.

LALLA, Evanthia; PAPAPANOU, Panos N. **Diabetes mellitus and periodontitis: A tale of two common interrelated diseases***Nature Reviews Endocrinology*Nat Rev Endocrinol, , 2011. DOI: 10.1038/nrendo.2011.106.

LARSSON, Lena; CASTILHO, Rogerio M.; GIANNOBILE, William V. Epigenetics and Its Role in Periodontal Diseases: A State-of-the-Art Review. **Journal of Periodontology**, [S. l.], v. 86, n. 4, p. 556–568, 2015. DOI: 10.1902/jop.2014.140559.

LEE, Jongwon et al. STAT5 is a key transcription factor for IL-3-mediated inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 30977, 2016. DOI: 10.1038/srep30977.

LEE, Kyoung-Mi et al. Inhibition of STAT5A promotes osteogenesis by DLX5 regulation. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 1136, 2018. DOI: 10.1038/s41419-018-1184-7.

LINDHE, Jan; LANG, Niklaus P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**. 6ª ed. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, 2018.

LINDROTH, Anders M.; PARK, Yoon Jung. Epigenetic biomarkers: A step forward for understanding periodontitis. **Journal of Periodontal and Implant Science**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 111–120, 2013. DOI: 10.5051/jpis.2013.43.3.111.

LIO, Chan Wang J.; RAO, Anjana. **TET enzymes and 5hMC in adaptive and innate immune systems** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00210.

LU, Henry Y.; TURVEY, Stuart E. **Human MALT1 deficiency and predisposition to infections** *Current Opinion in Immunology* Elsevier Ltd, , 2021. DOI: 10.1016/j.coi.2021.02.008.

MACHO-FERNANDEZ, E.; KOROLEVA, E. P.; SPENCER, C. M.; TIGHE, M.; TORRADO, E.; COOPER, A. M.; FU, Y. X.; TUMANOV, A. V. Lymphotoxin beta receptor signaling limits mucosal damage through driving IL-23 production by epithelial cells. **Mucosal immunology**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 403–13, 2015. DOI: 10.1038/mi.2014.78.

MARTÍNEZ-GARCÍA, Mireya; HERNÁNDEZ-LEMUS, Enrique. Periodontal Inflammation and Systemic Diseases: An Overview. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fphys.2021.709438.

MCALÉER, Jeremy P.; KOLLS, Jay K. Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. **Journal of leukocyte biology**, [S. l.], v. 90, n. 2, p. 263–270, 2011. DOI: 10.1189/jlb.0211099.

MEDARA, Nidhi; LENZO, Jason C.; WALSH, Katrina A.; O'BRIEN-SIMPSON, Neil M.; REYNOLDS, Eric C.; DARBY, Ivan B.; O'BRIEN-SIMPSON, Neil M.; REYNOLDS, Eric C.; DARBY, Ivan B. Peripheral T helper cell profiles during management of periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, [S. l.], v. 48, n. 1, 2021. DOI: 10.1111/jcpe.13389.

MEYLE, Joerg; CHAPPLE, Iain. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. **Periodontology 2000**, [S. l.], v. 69, n. 1, p. 7–17, 2015. DOI: 10.1111/prd.12104.

MONAJEMI, Mahdis et al. Malt1 deficient mice develop osteoporosis independent of osteoclast-intrinsic effects of Malt1 deficiency. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 106, n. 4, p. 863–877, 2019. DOI: 10.1002/JLB.5VMA0219-054R.

MORRIS, Rhiannon; KERSHAW, Nadia J.; BABON, Jeffrey J. The molecular details

of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. **Protein Science**, [S. l.], v. 27, n. 12, p. 1984–2009, 2018. DOI: 10.1002/pro.3519.

MOTTA, Raphael J. G.; ALMEIDA, Luciana Yamamoto; VILLAFUERTE, Kelly R. V.; RIBEIRO-SILVA, Alfredo; LEÓN, Jorge E.; TIRAPELLI, Camila. FOXP3+ and CD25+ cells are reduced in patients with stage IV, grade C periodontitis: A comparative clinical study. **Journal of Periodontal Research**, [S. l.], v. 55, n. 3, p. 374–380, 2020. DOI: 10.1111/jre.12721.

NAKAJIMA, T.; ODA, T.; OHSAWA, Y.; ITO, H.; SEYMOUR, G. J.; YAMAZAKI, K. Regulatory T-cells Infiltrate. [S. l.], p. 1–5, 2005.

NAKAMURA, Tsuneya; SETO, Masao; TAJIKA, Masahiro; KAWAI, Hiroki; YOKOI, Takio; YATABE, Yasushi; NAKAMURA, Shigeo. Clinical Features and Prognosis of Gastric MALT Lymphoma With Special Reference to Responsiveness to H. pylori Eradication and API2-MALT1 Status. **The American Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 103, n. 1, p. 62–70, 2008. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01521.x.

NEWMAN, Michael; TAKEI, Henry; KLOKKVOLD, Perry; CARRANZA, Fermin. **Periodontia Clínica**. 13. ed. Rio de Janeiro - RJ: GEN Guanabara Koogan, 2020.

NGUYEN, Quynh P.; DENG, Tianda Z.; WITHERDEN, Deborah A.; GOLDRATH, Ananda W. **Origins of CD4+ circulating and tissue-resident memory T-cells** Immunology Blackwell Publishing Ltd, , 2019. DOI: 10.1111/imm.13059.

NIE, Jia; LI, Yang Yang; ZHENG, Song Guo; TSUN, Andy; LI, Bin. FOXP3+ Treg cells and gender bias in autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 6, n. SEP, 2015. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00493.

OFFENBACHER, Steven. Periodontal Diseases: Pathogenesis. **Annals of Periodontology**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 821–878, 1996. DOI: 10.1902/annals.1996.1.1.821.

OHLRICH, E. J.; CULLINAN, M. P.; SEYMOUR, Gregory J. The immunopathogenesis of periodontal disease. **Australian Dental Journal**, [S. l.], v. 54, p. S2–S10, 2009. DOI: 10.1111/j.1834-7819.2009.01139.x.

OLIVEIRA, Naila F. P. et al. DNA methylation status of the IL8 gene promoter in oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, [S. l.], v. 36, n. 9, p. 719–725, 2009. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2009.01446.x.

OWEN, David L.; FARRAR, Michael A. STAT5 and CD4 + T Cell Immunity. **F1000Research**, [S. l.], v. 6, p. 32, 2017. DOI: 10.12688/f1000research.9838.1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28163905>. Acesso em: 21 nov. 2019.

PAN, Weiyi; WANG, Qingxuan; CHEN, Qianming. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. **International journal of oral science**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 30, 2019. DOI: 10.1038/s41368-019-0064-z. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31685798>. Acesso em: 24 nov. 2019.

PAPAPANOU, Panos N. et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *[S. l.]*, v. 89, p. S173–S182, 2018. DOI: 10.1002/JPER.17-0721.

PARACHURU, V. P. B.; 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. **Journal of Periodontal Research**, *[S. l.]*, v. 49, n. 6, p. 817–826, 2014. DOI: 10.1111/jre.12169.

PARACHURU, V. P. B.; COATES, D. E.; MILNE, T. J.; RICH, A. M.; SEYMOUR, G. J. FoxP3 + regulatory T cells, interleukin 17 and mast cells in chronic inflammatory periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, *[S. l.]*, v. 53, n. 4, p. 622–635, 2018. DOI: 10.1111/jre.12552.

PIHLSTROM, Bruce L.; MICHALOWICZ, Bryan S.; JOHNSON, Newell W. Periodontal diseases. **The Lancet**, *[S. l.]*, v. 366, n. 9499, p. 1809–1820, 2005. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67728-8.

PRUNICKI, Mary et al. Air pollution exposure is linked with methylation of immunoregulatory genes, altered immune cell profiles, and increased blood pressure in children. **Scientific Reports**, *[S. l.]*, v. 11, n. 1, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-83577-3.

RASMUSSEN, Kasper Dindler; HELIN, Kristian. **Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer** *Genes and Development* Cold Spring Harbor Laboratory Press, , 2016. DOI: 10.1101/gad.276568.115.

REBEAUD, Fabien et al. The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. **Nature Immunology**, *[S. l.]*, v. 9, n. 3, p. 272–281, 2008. DOI: 10.1038/ni1568.

REMELY, Marlene; AUMUELLER, Eva; MEROLD, Christine; DWORZAK, Simone; HIPPE, Berit; ZANNER, Julia; POINTNER, Angelika; BRATH, Helmut; HASLBERGER, Alexander G. Effects of short chain fatty acid producing bacteria on epigenetic regulation of FFAR3 in type 2 diabetes and obesity. **Gene**, *[S. l.]*, v. 537, n. 1, p. 85–92, 2014. DOI: 10.1016/j.gene.2013.11.081.

RICHTER, Gesa M. et al. Epigenetic adaptations of the masticatory mucosa to periodontal inflammation. **Clinical Epigenetics**, *[S. l.]*, v. 13, n. 1, p. 203, 2021. DOI: 10.1186/s13148-021-01190-7.

ROCHMAN, Yrina; SPOLSKI, Rosanne; LEONARD, Warren J. New insights into the regulation of T cells by γ c family cytokines. **Nature Reviews Immunology**, *[S. l.]*, v. 9, n. 7, p. 480–490, 2009. DOI: 10.1038/nri2580.

RUDENSKY, Alexander Y. Regulatory T cells and Foxp3. **Immunological Reviews**, *[S. l.]*, v. 241, n. 1, p. 260–268, 2011. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01018.x.

SABARISH, Ram; RAO, Suresh Ranga; LAVU, Vamsi. Natural T regulatory cells (n Treg) in the peripheral blood of healthy subjects and subjects with chronic periodontitis – A pilot study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, *[S. l.]*, v. 10, n. 3, p. ZC36–ZC39, 2016. DOI: 10.7860/JCDR/2016/15449.7446..

SAITO, Yoshimasa; KANAI, Yae; NAKAGAWA, Tohru; SAKAMOTO, Michiie; SAITO, Hidetsugu; ISHII, Hiromasa; HIROHASHI, Setsuo. Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. **International journal of cancer**, [S. l.], v. 105, n. 4, p. 527–32, 2003. DOI: 10.1002/ijc.11127.

SCHOLTEN, H. J.; POURTAHERIAN, A.; MIHAJLOVIC, N.; KORSTEN, H. H. M.; A. BOUWMAN, R. Improving needle tip identification during ultrasound-guided procedures in anaesthetic practice. **Anaesthesia**, [S. l.], v. 72, n. 7, p. 889–904, 2017. DOI: 10.1111/anae.13921.

SEHGAL, Pravin B.; YANG, Yang-Ming; YUAN, Huijuan; MILLER, Edmund J. STAT5a/b contribute to sex bias in vascular disease: A neuroendocrine perspective. **JAK-STAT**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 1–20, 2015. DOI: 10.1080/21623996.2015.1090658.

SHARMA, Anup; GERBARG, Patricia; BOTTIGLIERI, Teodoro; MASSOUMI, Lila; CARPENTER, Linda L.; LAVRETSKY, Helen; MUSKIN, Philip R.; BROWN, Richard P.; MISCHOULON, David. S-Adenosylmethionine (SAME) for Neuropsychiatric Disorders: A Clinician-Oriented Review of Research. **The Journal of clinical psychiatry**, [S. l.], v. 78, n. 6, p. e656, 2017. DOI: 10.4088/JCP.16R11113.

SHELBURNE, C. P. et al. Stat5 expression is critical for mast cell development and survival. **Blood**, [S. l.], v. 102, n. 4, p. 1290–1297, 2003. DOI: 10.1182/blood-2002-11-3490.

SHIAU, Harlan J.; AICHELMANN-REIDY, Mary E.; REYNOLDS, Mark A. Influence of sex steroids on inflammation and bone metabolism. **Periodontology 2000**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 81–94, 2014. DOI: 10.1111/prd.12033.

SHIAU, Harlan J.; REYNOLDS, Mark A. Sex Differences in Destructive Periodontal Disease: Exploring the Biologic Basis. **Journal of Periodontology**, [S. l.], v. 81, n. 11, p. 1505–1517, 2010. DOI: 10.1902/jop.2010.100045.

SILVA, Nora; ABUSLEME, Loreto; BRAVO, Denisse; DUTZAN, Nicolás; GARCIA-SESNICH, Jocelyn; VERNAL, Rolando; HERNÁNDEZ, Marcela; GAMONAL, Jorge. Host response mechanisms in periodontal diseases. **Journal of applied oral science: revista FOB**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 329–55, 2015. DOI: 10.1590/1678-775720140259.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 134–144, 1998. DOI: 10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x.

STARR, R.; HILTON, D. J. SOCS: suppressors of cytokine signalling. **The international journal of biochemistry & cell biology**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 1081–5, 1998.

STEFANOWICZ, Dorota et al. DNA Methylation Profiles of Airway Epithelial Cells and PBMCs from Healthy, Atopic and Asthmatic Children. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 9, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0044213.

SUBRAMANIAM, Dharmalingam; THOMBRE, Ravi; DHAR, Animesh; ANANT,

Shrikant. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. **Frontiers in oncology**, [S. l.], v. 4, p. 80, 2014. DOI: 10.3389/fonc.2014.00080.

TAJIMA, Shoji; SUETAKE, Isao; TAKESHITA, Kohei; NAKAGAWA, Atsushi; KIMURA, Hironobu. Domain Structure of the Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b DNA Methyltransferases. *In: Advances in experimental medicine and biology*. [s.l.: s.n.], v. 945p. 63–86. DOI: 10.1007/978-3-319-43624-1_4.

TAKAI, R. et al. DNA hypermethylation of extracellular matrix-related genes in human periodontal fibroblasts induced by stimulation for a prolonged period with lipopolysaccharide derived from *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Periodontal Research**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 508–517, 2016. DOI: 10.1111/jre.12330.

TAKATORI, Hiroaki; NAKAJIMA, Hiroshi; HIROSE, Koichi; KAGAMI, Shin-ichiro; TAMACHI, Tomohiro; SUTO, Akira; SUZUKI, Kotaro; SAITO, Yasushi; IWAMOTO, Itsuo. Indispensable role of Stat5a in Stat6-independent Th2 cell differentiation and allergic airway inflammation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 174, n. 6, p. 3734–40, 2005. DOI: 10.4049/jimmunol.174.6.3734.

TANAKA, Keiko; MIYAKE, Yoshihiro; HANIOKA, Takashi; FURUKAWA, Shinya; MIYATAKE, Nobuyuki; ARAKAWA, Masashi. The<i>i></i> IL18<i>i></i> Promoter Polymorphism, rs1946518, Is Associated with the Risk of Periodontitis in Japanese Women: The Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 243, n. 3, p. 159–164, 2017. DOI: 10.1620/tjem.243.159.

TAO, Jin-Hui; CHENG, Miao; TANG, Jiang-Ping; LIU, Qin; PAN, Fan; LI, Xiang-Pei. Foxp3, Regulatory T Cell, and Autoimmune Diseases. **Inflammation**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 328–339, 2016. DOI: 10.1007/s10753-016-0470-8.

TAUBMAN, Martin A.; VALVERDE, Paloma; HAN, Xiaozhe; KAWAI, Toshihisa. Immune Response : The Key to Bone Resorption in Periodontal Disease. **Journal Periodontology**, [S. l.], v. 2005, n. November, 2005.

TOKER, Aras; HUEHN, Jochen. To be or not to be a Treg cell: lineage decisions controlled by epigenetic mechanisms. **Science signaling**, [S. l.], v. 4, n. 158, p. pe4, 2011. DOI: 10.1126/scisignal.2001783.

TUKIAINEN, Taru et al. Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. **Nature**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1038/nature24265.

TUREK-PLEWA, Justyna; JAGODZIŃSKI, Paweł P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. **Cellular & molecular biology letters**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 631–47, 2005.

UEHARA, Osamu; ABIKO, Yoshihiro; SAITOH, Masato; MIYAKAWA, Hiroshi; NAKAZAWA, Futoshi. Lipopolysaccharide extracted from *Porphyromonas gingivalis* induces DNA hypermethylation of runt-related transcription factor 2 in human periodontal fibroblasts. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 176–181, 2014. DOI: 10.1016/j.jmii.2012.08.005.

VALERIO, M. S.; KIRKWOOD, K. L. **Sexual Dimorphism in Immunity to Oral**

Bacterial Diseases: Intersection of Neutrophil and Osteoclast Pathobiology *Journal of Dental Research* SAGE Publications Inc., , 2018. DOI: 10.1177/0022034518798825.

VIANA, Michelle Beatriz; CARDOSO, Fabiano Pereira; DINIZ, Marina Gonçalves; COSTA, Fernando Oliveira; DA COSTA, José Eustáquio; GOMEZ, Ricardo Santiago; MOREIRA, Paula Rocha. Methylation pattern of IFN- γ and IL-10 genes in periodontal tissues. **Immunobiology**, [S. l.], v. 216, n. 8, p. 936–941, 2011.

VILLARINO, Alejandro V; KANNO, Yuka; O'SHEA, John J. Mechanisms and consequences of Jak–STAT signaling in the immune system. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 374–384, 2017. DOI: 10.1038/ni.3691.

VOS, Theo et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, [S. l.], v. 386, n. 9995, p. 743–800, 2015. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60692-4.

VOSKUHL, Rhonda R.; SAWALHA, Amr H.; ITOH, Yuichiro. Sex chromosome contributions to sex differences in multiple sclerosis susceptibility and progression. **Multiple Sclerosis Journal** [S. l.], v. 24, n. 1, p. 22–31, 2018. DOI: 10.1177/1352458517737394.

WANG, Qian; ZHOU, Xinyi; JIANG, Jingjing; ZHANG, Peng; XIA, Sisi; DING, Yi; WANG, Qi. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D3 levels and severity of chronic periodontitis in type 2 diabetic patients: A cross-sectional study. **Journal of Periodontal Research**, [S. l.], v. 54, n. 6, p. 671–680, 2019. DOI: 10.1111/jre.12669..

WEI, Lai; LAURENCE, Arian; O'SHEA, John J. New insights into the roles of Stat5a/b and Stat3 in T cell development and differentiation. **Seminars in cell & developmental biology**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 394–400, 2008. DOI: 10.1016/j.semcd.2008.07.011.

WHITE, Gregory P.; WATT, Paul M.; HOLT, Barbara J.; HOLT, Patrick G. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 168, n. 6, p. 2820–7, 2002.

WIERDA, Rutger J.; GEUTSKENS, Sacha B.; JUKEMA, J. Wouter; QUAX, P. H. a; VAN DEN ELSEN, Peter J. Epigenetics in atherosclerosis and inflammation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 1225–1240, 2010. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01022.x.

WU, Ming; XUE, Yan-Hui. [Main regulatory factors for differentiation, development and function of naturally occurred CD4+ CD25+ regulatory T cells]. **Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 207–12, 2008.

YAMAOKA, Kunihiro; SAHARINEN, Pipsa; PESU, Marko; HOLT, Vance E. T.; SILVENNOINEN, Olli; O'SHEA, John J.; O'SHEA, John J. The Janus kinases (Jaks). **Genome biology**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. 253, 2004. DOI: 10.1186/gb-2004-5-12-253.

YILMAZ, Özlem; WATANABE, Kiyoko; LAMONT, Richard J. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 305–314, 2002. DOI: 10.1046/j.1462-5822.2002.00192.x.

ZAMBON, J. J. **Periodontal diseases: microbial factors**. **Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology** Ann Periodontol, , 1996. DOI: 10.1902/annals.1996.1.1.879.

ZHANG, Shaoping; BARROS, Silvana P.; MORETTI, Antonio J.; YU, Ning; ZHOU, Jing; PREISSER, John S.; NICULESCU, Mihai D.; OFFENBACHER, Steven. Epigenetic Regulation of *TNFA* Expression in Periodontal Disease. **Journal of Periodontology**, [S. l.], v. 84, n. 11, p. 1–14, 2013. DOI: 10.1902/jop.2013.120294..

ZHANG, T. et al. Smad6 Methylation Represses NFκB Activation and Periodontal Inflammation. **Journal of Dental Research**, [S. l.], v. 97, n. 7, p. 810–819, 2018. DOI: 10.1177/0022034518755688.

ZHAO, Hai; LIAO, Xuelian; KANG, Yan. Tregs : where we Are and what Comes Next ? **Frontiers in immunology**, [S. l.], v. 8, n. November, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01578.

ZHU, Ling; JIA, Lei; LIU, Zhongwei; ZHANG, Yong; WANG, Junkui; YUAN, Zuyi; HUI, Rutai. Elevated methylation of FOXP3 (Forkhead Box P3)-TSDR (Regulatory T-Cell-Specific Demethylated Region) is associated with increased risk for adverse outcomes in patients with acute coronary syndrome. **Hypertension**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 581–589, 2019. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12852.

ZHU, Xiaohua; CHEN, Qiang; LIU, Zhiqiang; LUO, Daya; LI, Lan; ZHONG, Ying. Low expression and hypermethylation of FOXP3 in regulatory T cells are associated with asthma in children. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [S. l.], v. 19, n. 3, 2020. DOI: 10.3892/etm.2020.8443.

ZORINA, O. A.; AIMADINOVA, N. K.; BASOVA, A. A.; REBRIKOV, D. V. [The relationship of molecular genetic markers with clinical signs and risk factors of periodontitis]. **Stomatologiya**, [S. l.], v. 95, n. 5, p. 12–18, [s.d.].

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: _____

APÊNDICE C – ARTIGO SUBMETIDO REFERENTE A TESE

Title: Association of *FOXP3* and *STAT5A* methylation profiles with stage III grade B periodontitis in male gingival tissues.

Luiz Paulo Carvalho Rocha¹, Simone Angélica de Faria Amormino¹, Telma Cristina Arão¹, Nayágara Moreira Dias da Silva¹, José Eustáquio da Costa², Walderez Ornelas Dutra¹, Ricardo Santiago Gomez², Paula Rocha Moreira¹

1.Laboratory of Cell-Cell Interactions, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

2.Department of Clinical, Pathology and Dental Surgery, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

*Corresponding author: Paula Rocha Moreira

Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia, Laboratório de Biologia das Interações Celulares, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Phone: 55-31-3409-3003

E-mail address: paularocha@ufmg.br

ABSTRACT

Aim: We evaluated the methylation and transcription profile of genes related to inflammatory signaling pathways in stage III grade B periodontitis.

Material and Methods: Gingival fragments were collected from periodontitis and healthy individuals. We evaluated a panel containing 22 genes related to inflammatory signaling pathways in initial methylation screening. After selecting the altered genes, we performed data validation with the Methyl Profiler DNA Methylation qPCR assay in 60 samples, followed by real-time polymerase chain reaction (qPCR). The transcription levels were evaluated by qPCR.

Results: We observed an unmethylated profile in the majority of genes evaluated in both groups. *MALT1*, *LTB*, *FOXP3*, and *STAT5A* genes presented a hypermethylation profile in control group compared to periodontitis group. Data validation confirmed the hypomethylation of *MALT1*, *LTB* and *STAT5A* in periodontitis group compared to the control group ($p=0.005$, $p=0.004$, $p=0.015$, respectively). In the male periodontitis group, it was observed a *FOXP3* hypermethylation and low transcription ($p=0,037$); as well as a hypomethylation of *STAT5A* ($p=0,024$). Female periodontitis group showed a negative correlation between *STAT5A* transcription and probing depth.

Conclusion: The DNA methylation in intracellular signaling pathways is an epigenetic mechanism present in gingival tissues from individuals with stage III grade B periodontitis.

Keywords: Epigenetic, DNA methylation, Periodontitis, FOXP3, STAT5A

Clinical Relevance

Scientific rationale for the study: DNA methylation occurs in human cells with the function of modulating gene expression. This modulation becomes even more critical in inflammatory contexts where a chronic destructive profile is observed, such as periodontitis. We studied the methylation pattern of genes that participate in the signaling and characterization of the inflammatory profile in patients with stage III grade B periodontitis.

Principal findings: We observed a specific methylation patterns of the FOXP3 and STAT5A genes in male gingival tissues with periodontitis. More studies are needed to clarify the effects of epigenetics on cellular pathways in inflammatory processes.

Practical implications: The search for target genes controlled by epigenetics and the characterization of groups with specific methylation profiles can be essential tools for developing specific therapies.

INTRODUCTION

Epigenetic alterations have been evaluated in periodontitis in search of target genes that could influence the pathogenesis of the disease (Kim et al. 2021). These alterations are characterized by changes in gene expression without altering the DNA sequence and include mechanisms such as histone modifications, non-coding RNAs, and DNA methylation (Richter et al. 2021; Khouly et al. 2020).

DNA methylation is the most common epigenetic mechanism in human cells. It can be modified by physiological processes, such as the inactivation of the X chromosome in women (Tukiainen et al. 2017), and pathological processes, such as inflammation and infection (Ari, Cherukuri, and Namasivayam 2016). Furthermore, DNA methylation is a reversible process that can be influenced by external factors, such as exposure to toxins and nutrition (Jiang et al. 2020).

In periodontitis, bacterial stimuli, smoking, and the inflammatory process have been described in the literature as potential modifiers of the methylation pattern (Larsson, Castilho, and Giannobile 2015). Changes in the DNA methylation profile have been reported in periodontitis in constitutional and inflammatory genes (Kim et al. 2021; Luo et al. 2018). Genes that participate in inflammatory cell signaling, are important targets for regulation, as their activity can determine a destructive pro-inflammatory or anti-inflammatory profile in the affected site.

Pro-inflammatory cytokine genes showed lower levels of DNA methylation and higher levels of gene expression in gingival tissues of periodontitis patients compared to healthy patients (Oliveira et al. 2009; Andia et al. 2010). Genes related to host defense mechanisms and cell differentiation showed altered DNA methylation levels in periodontitis patients (de Faria Amormino et al. 2013; Azevedo et al. 2020) and in vitro and in vivo models stimulated with periodontopathogens (Jurdziński, Potempa, and Grabiec 2020). Another significant finding was observed in genes related to tissue repair, epithelial barrier integrity, and innate immune response, which were strongly hypomethylated (Richter et al. 2021).

Although investigations on DNA methylation have contributed to the knowledge of their activity in periodontitis, epigenetic alterations in inflammatory signaling pathway-related genes may still exist. Transcription factors and mechanisms related to inter and intracellular signal transmission are fundamental for cell activity, as

well as for the production of cytokines and cell differentiation. Changes in the methylation pattern were observed in the STAT5A, GATA3 and NFKB genes and indicate that cellular processes are altered through epigenetics in periodontitis (Barros and Offenbacher 2014; Diomedea et al. 2017; Azevedo et al. 2020).

Few studies in the literature have evaluated genes that interact and participate in the same cell signaling pathway. Given the importance of cytokines production and cell differentiation in the periodontitis, and of DNA methylation role in gene expression, this study aims to elucidate the methylation pattern in genes that participate in the cytokine production and cell differentiation cascades in periodontitis.

MATERIAL AND METHODS

Study population

The study population consisted of healthy individuals without periodontitis ($n = 30$) and individuals with periodontitis ($n = 30$). Individuals included in the study were attended at the Faculty of Dentistry of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) and the Dental Specialties Center of Venda Nova, Belo Horizonte, MG, Brazil from 2013 to 2019. All patients underwent anamnesis, clinical and radiographic examinations by one experienced Periodontist, previously calibrated. They signed consent forms and were informed about the purpose and methods of the study. This study was approved by the local Ethics Committee (ETIC:075/11) and a signed informed consent of all subjects was obtained.

Clinical signs of inflammation, clinical attachment level (CAL) and probing depth (PD) were used as criteria for the diagnosis of periodontitis. Individuals with no clinical and radiographic evidence of periodontal disease, probing depth (PD) > 3 mm and no bleeding probe were used as control (C group). Those who exhibited more than three sites with $PD \geq 4$ mm, $CAL \geq 5$ mm, and clinical signs of inflammation were considered on the periodontitis group (P group).

The exclusion criteria applied were antibiotic or anti-inflammatory use in the last six months, pregnant or lactating women, altered systemic conditions, dental elements with periodontal disease, except for periodontitis in the P group, less than 15 teeth, and smoking history. Despite the presence of periodontitis, the patients included in this study were, otherwise, systemically healthy.

For the P group, gingival tissues were collected from periodontal pockets during the surgical phase of treatment. An equivalent area was collected during exodontia and other elective surgeries for the C group. The samples were divided into two parts. One part was stored in RNAholder solution (BioAgency, Brazil) for mRNA evaluation. The other part was stored in Tissue-Tek (Sakura, Torrance, CA, USA) for DNA analysis methylation. The individuals were categorized according to periodontal diseases new classification of the American Academy of Periodontology and the European Federation of Periodontology (Papapanou et al. 2018).

DNA extraction and quantification

All gingival fragments stored in Tissue-Tek (Sakura, USA) were incubated with proteinase K at 55°C until complete digestion. According to the manufacturer's instructions, we submitted the samples to DNA isolation by the DNeasy Blood & Tissue Kit (250) (Cat. No. 69506 / QIAGEN Sciences, Maryland 20874, USA). The obtained gDNA was quantified in the Denovix spectrophotometer (DeNovix, Wilmington, USA). Pure DNA were those that presented DNA / protein ratio (260/280) reading above 1.8 and ratio (260/230) above 1.7.

DNA methylation panel analysis

In this step, gDNA extracted from 6 samples from each group were combined in two pools and analyzed on a DNA methylation panel containing 22 genes using the EpiTect Methyl II Signature Human Cytokine Production PCR Array (product nº 335212, catalog nº EAHS 541Z, Qiagen, Maryland 20874, USA). In the panel evaluated, the genes are related to the production of cytokines, composed of molecules that participate in the signaling pathway, functional regulators of T and B cells, transcription and translation factors (BCL10, BCL3, FOXP3, HMOX1, IL12A, MALT1, MAP3K7, SOD1, STAT5A, TRAF2, TRAF6, INHA, INHBA, GATA3, IRF1, SMAD3, IGF2BP2, ELA2, LTB, MYD88, NOD1, TLR2). The samples were treated by the protocol of EpiTect Methyl DNA Restriction Kit (Qiagen, Maryland 20874, USA), according to the manufacturer's instruction, which uses restriction enzymes to identify methylated and unmethylated DNA. We conducted the qPCR array in a StepOnePlus instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). We analyzed the CT values obtained

using specific software provided by the manufacturer and quantified the methylation levels. Genes that showed different methylation patterns between the evaluated groups, greater than 20%, were selected for further analysis with more samples.

DNA methylation assay analysis

The genes that showed a different methylation profile among the groups in the previous step were selected and analyzed in the total sample collected (n=60) to confirm the data obtained in the panel. We performed the same procedures for DNA extraction, restriction enzyme treatment, and qPCR evaluation as previously described. The selected genes and the location of the respective CpGs islands are shown in Table 1.

RNA extraction and quantification

We performed RNA extraction using the Trizol reagent protocol following the manufacturer's recommendations (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA). The RNA pellet was dried at room temperature and then diluted in 15 µl of DEPC nuclease-free water (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA).

Synthesis of complementary DNA – cDNA

After RNA isolation, we submitted the samples to treatment with Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. 1µg of RNA was diluted in a final volume of 8µL, containing 1µL of buffer and 1µL of DNase enzyme. We added 1µL of EDTA after 15 minutes of incubation at room temperature, and we incubated the samples for 10 minutes at 70°C. We synthesized the complementary DNA (cDNA) following reverse transcription reaction using the SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA).

Analysis of gene transcription

We evaluated the cDNA samples by the qPCR technique in the CFX96 (Biorad). We did the reactions with the TaqMan_Gene expression assay for the selected genes, and we used the Beta-actin gene as endogenous control (Table 2). The relative expression of the target gene was calculated and normalized with the endogenous. We evaluated

the results of target gene transcription normalized with the endogenous and relative to a calibrator sample. A pool of blood samples from healthy subjects formed the calibration sample. We performed all reactions in duplicates. The gene transcription was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Applied Biosystems User Bulletin No. 2) as previously described (Livak and Schmittgen 2001).

Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was used to determine the sample distribution pattern. Subsequently, the Mann-Whitney test with Bonferroni correction was used in the comparative statistical analyzes. For correlation analysis, we employed the Spearman's Rank-Order Correlation. All statistical analyses were conducted in SPSS 21.0 (IBM, Chicago, EUA). $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Demographic and clinic characteristics

Table 3 shows the demographic and clinical parameters of the C and P groups. Consistent with the diagnosis and the destruction of tooth-supporting tissue, P patients presented higher probing depth, clinical attachment loss, and percentage of bleeding on probing than C participants. The P group also displayed alveolar bone loss. All individuals included in the P group were diagnosed with stage III grade B periodontitis.

Methylation panel of genes related inflammatory signaling pathway and cytokine production

In the C group, an unmethylated profile was observed for most of the evaluated genes. Only FOXP3, STAT5A, MALT1, and LTB genes showed a higher percentage of methylation. Methylation values were in a range of 50-80% in these genes. In the P group also was observed an unmethylated profile for most of the genes. However, we observed a decrease in methylation levels from the FOXP3, STAT5A, MALT1, and LTB genes in the P group compared to the C group. The MALT1, LTB, and STAT5A

genes showed the most significant differences, with a decrease of approximately 40-60% of methylation level. The FOXP3 gene showed a decrease of 20% (Figure 1).

Methylation pattern of MALT1, LTB, STAT5A and FOXP3

To confirm the data obtained in the panel, we evaluated the genes that showed different methylation profiles among the groups with a larger number of samples. The C group showed higher methylation percentages to the P group for MALT1, LTB, and STAT5 genes (Figure 2 A, B, C). The median of methylation levels presented difference among groups: 1.09% for MALT1 ($p=0,005$), 0.31% for LTB ($p=0,004$) and 3,35% for STAT5A ($p=0,015$). No significant difference among groups considering the FOXP3 gene was observed ($p=0,376$) (Figure 2D).

Since the findings in the literature indicate that the STAT5A and FOXP3 genes may undergo sexual dimorphism in the regulation of their molecular activity, we performed analyzes considering sex. In STAT5A analysis showed a significant difference only among male individuals, being the C group with the highest methylation values ($p=0,024$) (Figure 2E). Considering the FOXP3 gene, we also observed a significant difference among men from C and P groups, with the hypermethylated P group ($p=0,037$). In the C group, women showed higher methylation levels in the FOXP3 gene than men ($p=0,002$) (Figure 2F).

Transcription levels of MALT1, LTB, STAT5A and FOXP3

None of the evaluated genes showed statistical differences in transcription between groups C and P (Figure 3). We also performed sex analysis for transcription levels in STAT5A and FOXP3 genes. For STAT5A, no difference was observed among groups (Figure 3E). For FOXP3, statistical differences were observed between men from C and P groups ($p=0,037$), with higher transcription for the C group. We observed among the P groups, a higher transcription for the female group compared to male group ($p=0,047$) (Figure 3F).

Correlation considering methylation, transcription and PD

None of the evaluated genes showed a correlation between methylation percentages and transcription levels (Data not shown). We do not observe a correlation between methylation percentages and PD (Data not shown). We only observe a correlation between transcription levels and PD in the STAT5A gene (Figure 4). Female P group P showed a strong negative correlation between STAT5A and PD transcription levels ($p=0,030$; $R= -0,680$) (Figure 4B).

DISCUSSION

In the present study, a methylation pattern in genes related to inflammatory signaling pathways and cytokine production was screening in order to identify potential targets in periodontitis. The MALT1, LTB, STAT5A, and FOXP3 genes showed a variation of at least 20% in the methylation profile between the C and P groups. After the validation stage, the MALT1, LTB, and STAT5A genes showed an unmethylated profile in the P group compared to the C group, suggesting a loss of methylation in these genes in periodontitis.

MALT1 and LTB regulation may be important in diseases with inflammatory profile, such as periodontitis. MALT1 is an intracellular signaling protein expressed in several cell types and mediates NF κ B signaling, cell adhesion and proliferation, and mRNA stabilization of IL-2, IL-6, and IL-12 (Demeyer, Staal, and Beyaert 2016). MALT1 activity has been essential in inflammatory responses to bacterial infections and their products, and its deficiency is related to pathological bone degradation (Rebeaud et al. 2008; Monajemi et al. 2019). LT β is a binder protein that stimulates surface-expressed tumor necrosis factor receptor (TNFRSF) superfamily members of various cell types, especially the lymphocyte lineage (Macho-Fernandez et al., 2015). Garlet (2010) observed a rapid upregulation of LTB in response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in an animal model. Furthermore, Gupta et al. (2020) observed a higher expression of LTB in patients with systemically healthy periodontitis compared to patients with periodontitis and bronchiectasis. In this study, the MALT1 and LTB genes showed statistical differences in the methylation profile among the groups, but the result should be considered with caution. The difference of methylation levels in groups studied was very small, not exceeding 2%. Furthermore, no difference in transcription was detected in our study. The differences found in methylation levels

may have no biological influence and not affect the gene transcription process. In the literature, the methylation and transcription of MALT1 and LTB are still poorly explored.

STAT5A is a transcription factor expressed in several cell types and participates in the JAK/STAT signaling pathway, one of the most important and fast pathways in the conduction of information received on the membrane surface and translocated to the nucleus (Jenks et al. 2013; Kanai et al. 2014; Wu and Xue 2008). As a result, it stimulates the expression of several cytokines, as well as the production of the molecules that will participate in the phenotype of cell development (Banerjee et al. 2017; Kagami et al. 2001). STAT5 is involved in the process of T cell differentiation. It participates in Th1 differentiation through the binding of IL-12 and into Th2 by IL-4 and Treg by IL-2, and STAT5A is more closely related to these latter subtypes (Owen and Farrar 2017).

In this study, it was seen that individuals with periodontitis had a lower STAT5A methylation levels than control subjects, which was evident in the analysis considering only men. This data is in accordance with Azevedo et al. (2020) that observed a hypomethylated profile of the STAT5A gene in severe generalized periodontitis. The presence of a hypomethylated profile of the STAT5A gene in the P group could indicate a gene more active and with higher transcription, but this was not observed in the transcription analysis. Possibly, other regulatory mechanisms of STAT5A may be acting and influencing the transcript levels, as histone modifications, microRNAs and genetic polymorphisms (Martínez-García and Hernández-Lemus 2021).

The literature is scarce on the evaluation of STAT5A in periodontitis. Gingival tissues from periodontal patients showed lowest methylation (Azevedo et al. 2020), highest transcription (Parachuru et al. 2018) and highest expression of the STAT5 (Wang et al. 2019). Aquino et al. (2009) suggested that STAT5 activity in periodontitis is related to the complexity of the local inflammatory response, either through cytokine signaling or the composition of bacterial stimuli. Furthermore, only bacterial stimuli from *P. gingivalis* seem to have no neutralizing effects on STAT5A activity (Khalaf, Demirel, and Bengtsson 2013).

Considering the clinical parameter, a negative correlation between STAT5A transcription and PD was detected in women. This finding suggests that mechanisms related to progression of periodontitis can regulate the transcription of STAT5A in these individuals, modulating the host response. A negative effect on STAT5A transcription inhibition may be related to a decrease in an efficient and regulatory immune response, resulting in tissue loss and deeper clinical pockets in women. Studies showed that STAT5A activity influences the proportion of Th2 and Treg cell populations (Takatori et al. 2005). The differentiation of Th2 cells is dependent on the IL-2/STAT5 signaling pathway, including Treg cells; and STAT5A participates in the recruitment of TETs for the FOXP3 demethylation process and increased expression of this molecule (Gaddis, Michalek, and Katz 2011).

Another gene evaluated in this study was the FOXP3 gene. FOXP3 is a transcription factor and is intrinsically linked to Treg cell activity. The expression of this gene characterizes this cell subtype and induces the expression of anti-inflammatory cytokines IL-10, TGF- β and inhibits pro-inflammatory cytokines IL-2 and IL-4 (Holmes, Gao, and Su 2011; Rudensky 2011). As the FOXP3 gene is located on the X chromosome and women have the inactivation of one X chromosome by methylation, an analysis considering the sex was performed to avoid possible bias (Nie et al. 2015; Voskuhl, Sawalha, and Itoh 2018; Tukiainen et al. 2017). It was seen a heterogeneous pattern of FOXP3 methylation among the groups. Men with periodontitis showed a higher methylation level compared to the C group, as well as lower FOXP3 transcription levels. These findings suggests that the regulatory role of Treg cells is impaired in men with stage III grade B periodontitis.

This result is consistent with literature data on the decrease in the proportion of Treg cells in advanced periodontal lesions (Cardoso et al. 2008; Nakajima et al. 2005; Parachuru et al. 2014). CD4⁺ Treg cells are related to the production of anti-inflammatory cytokines and the control of inflammatory processes, while CD8⁺ Treg cells are related to the suppression of bone destruction and the induction of alveolar bone formation (Han et al. 2018; Sabarish, Rao, and Lavu 2016). The reduction in FOXP3 levels in group P patients may indicate a reduction in the activity of these cell phenotypes and the consequent evolution of the disease.

So far, no study about the methylation pattern of the FOXP3 gene was performed in periodontitis. However, some studies have demonstrated the relationship of FOXP3 methylation in other diseases. FOXP3 hypermethylation was associated with a higher risk in acute coronary syndrome and inversely proportional to the percentages of TGF- β and IL-10 (L. Zhu et al. 2019). In addition, a negative impact of FOXP3 methylation has been observed in diseases such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), hypertension, and primary biliary cholangitis (Du et al. 2019; Prunicki et al. 2021; X. Zhu et al. 2020). In dentistry, the FOXP3 hypermethylation was observed in periapical granulomas and cysts, as well as the low transcription (Campos et al. 2015).

Sexual dimorphisms are present in many human diseases. Sex-specific differences are described in the periodontitis considering the oral microbiome and the risk for destructive periodontal disease (Zhao et al. 2021; Shiao and Reynolds 2010). The existence of an association of sex hormone levels with periodontitis, inflammation and bone turnover were described (Steffens et al. 2015). In our study, we observed differences in STAT5A and FOXP3 methylation profile in analysis considering the sex, which highlights the importance of studying the specific epigenetic impacts in both sexes.

Together, these findings suggest that DNA methylation in intracellular signaling pathways is an epigenetic mechanism present in gingival tissues from individuals with stage III grade B periodontitis. Additional studies are needed to clarify the effects of epigenetics on cellular pathways in inflammatory processes.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais and Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Programa Institucional de Auxílio à Pesquisa de Doutores Recém-Contratados da PRPq/UFMG) (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). RSG and WOD are CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) fellows.

CONFLICT OF INTEREST

There are no conflicts of interest associated with this work.

REFERENCES

- Andia, Denise C., Naila F.P. de Oliveira, Renato C.V. Casarin, Marcio Z. Casati, Sergio R.P. Line, and Ana P. de Souza. 2010. "DNA Methylation Status of the *IL8* Gene Promoter in Aggressive Periodontitis." *Journal of Periodontology* 81 (9): 1336–41. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100082>.
- Aquino, Sabrina Garcia de, Fabio Renato Manzolli Leite, Dagmar Ruth Stach-Machado, Juliete Aparecida Francisco da Silva, Luís Carlos Spolidorio, and Carlos Rossa. 2009. "Signaling Pathways Associated with the Expression of Inflammatory Mediators Activated during the Course of Two Models of Experimental Periodontitis." *Life Sciences* 84 (21–22): 745–54. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.03.001>.
- Ari, Geetha, Sandhya Cherukuri, and Ambalavanan Namasivayam. 2016. "Epigenetics and Periodontitis: A Contemporary Review." *Journal of Clinical and Diagnostic Research* : JCDR 10 (11): ZE07–9. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/21025.8864>.
- Azevedo, Andrea Mara, Luiz Paulo Carvalho Rocha, Simone Angélica de Faria Amormino, Carolina Cavaliere Gomes, Walderez Ornelas Dutra, Ricardo Santiago Gomez, José Eustáquio da Costa, and Paula Rocha Moreira. 2020. "DNA Methylation Profile of Genes Related to Immune Response in Generalized Periodontitis." *Journal of Periodontal Research* 55 (3): 426–31. <https://doi.org/10.1111/jre.12726>.
- Banerjee, Shubhasree, Ann Biehl, Massimo Gadina, Sarfaraz Hasni, and Daniella M. Schwartz. 2017. "JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects." *Drugs* 77 (5): 521–46. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0701-9>.
- Barros, Silvana P., and Steven Offenbacher. 2014. "Modifiable Risk Factors in Periodontal Disease: Epigenetic Regulation of Gene Expression in the Inflammatory Response Barros & Offenbacher Epigenetics in Periodontal Disease." *Periodontology 2000* 64 (1): 95–110. <https://doi.org/10.1111/prd.12000>.
- Campos, Kelma, Carolina F. Franscisoni, Valerie Okehie, Leticia C. de Souza, Ana Paula F. Trombone, Ariadne Letra, Gustavo P. Garlet, Ricardo S. Gomez, and Renato M. Silva. 2015. "FOXP3 DNA Methylation Levels as a Potential Biomarker in the Development of Periapical Lesions." *Journal of Endodontics* 41 (2): 212–18. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.10.003>.
- Cardoso, Cristina Ribeiro, Gustavo Pompermaier Garlet, Ana Paula Moreira, Wálter Martins Júnior, Marcos Antônio Rossi, and João Santana Silva. 2008. "Characterization of CD4+CD25+ Natural Regulatory T Cells in the Inflammatory Infiltrate of Human Chronic Periodontitis." *Journal of Leukocyte Biology* 84 (1):

311–18. <https://doi.org/10.1189/jlb.0108014>.

- Demeyer, Annelies, Jens Staal, and Rudi Beyaert. 2016. “Targeting MALT1 Proteolytic Activity in Immunity, Inflammation and Disease: Good or Bad?” *Trends in Molecular Medicine* 22 (2): 135–50. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2015.12.004>.
- Diomede, Francesca, Soundara Rajan Thangavelu, Ilaria Merciaro, Monica D’Orazio, Placido Bramanti, Emanuela Mazzon, and Oriana Trubiani. 2017. “Porphyromonas Gingivalis Lipopolysaccharide Stimulation in Human Periodontal Ligament Stem Cells: Role of Epigenetic Modifications to the Inflammation.” *European Journal of Histochemistry* 61 (3): 231–37. <https://doi.org/10.4081/ejh.2017.2826>.
- Du, Xizi, Lin Yuan, Mengping Wu, Meichao Men, Ruoxi He, Leyuan Wang, Shuangyan Wu, et al. 2019. “Variable DNA Methylation of Aging-Related Genes Is Associated with Male COPD.” *Respiratory Research* 20 (1). <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1215-7>.
- Faria Amormino, Simone Angélica de, Telma Cristina Arão, Adriana Machado Saraiva, Ricardo Santiago Gomez, Walderez Ornelas Dutra, José Eustáquio José Eustáquio da Costa, Jeane de Fátima Correia Silva, et al. 2013. “Hypermethylation and Low Transcription of TLR2 Gene in Chronic Periodontitis.” *Human Immunology* 74 (9): 1231–36. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2013.04.037>.
- Gaddis, Dalia E., Suzanne M. Michalek, and Jannet Katz. 2011. “TLR4 Signaling via MyD88 and TRIF Differentially Shape the CD4 + T Cell Response to Porphyromonas Gingivalis Hemagglutinin B.” *The Journal of Immunology* 186 (10): 5772–83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003192>.
- Garlet, G P. 2010. “Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Re-Appraisal from Host Defense and Tissue Destruction Viewpoints.” *Journal of Dental Research* 89 (12): 1349–63. <https://doi.org/10.1177/0022034510376402>.
- Han, Y. K., Y. Jin, Y. B. Miao, T. Shi, and X. P. Lin. 2018. “CD8+ Foxp3+ T Cells Affect Alveolar Bone Homeostasis via Modulating Tregs/Th17 During Induced Periodontitis: An Adoptive Transfer Experiment.” *Inflammation*, June, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0822-7>.
- Holmes, Derek, Jianmei Gao, and Lishan Su. 2011. “Foxp3 Inhibits HDAC1 Activity to Modulate Gene Expression in Human T Cells.” *Virology* 421 (1): 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.09.002>.
- Jenks, Jennifer A., Scott Seki, Takahiro Kanai, Jennifer Huang, Alexander A. Morgan, Renata C. Scalco, Ruhi Nath, et al. 2013. “Differentiating the Roles of STAT5B and STAT5A in Human CD4+ T Cells.” *Clinical Immunology* 148 (2): 227–36. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.04.014>.
- Jiang, Yiyang, Jingfei Fu, Juan Du, Zhenhua Luo, Lijia Guo, Junji Xu, and Yi Liu. 2020. “DNA Methylation Alterations and Their Potential Influence on Macrophage in Periodontitis.” *Oral Diseases*. <https://doi.org/10.1111/odi.13654>.

- Jurdziński, Krzysztof T., Jan Potempa, and Aleksander M. Grabiec. 2020. "Epigenetic Regulation of Inflammation in Periodontitis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Potential." *Clinical Epigenetics*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00982-7>.
- Kagami, S, H Nakajima, A Suto, K Hirose, K Suzuki, S Morita, I Kato, Y Saito, T Kitamura, and I Iwamoto. 2001. "Stat5a Regulates T Helper Cell Differentiation by Several Distinct Mechanisms." *Blood* 97 (8): 2358–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11290598>.
- Kanai, Takahiro, Scott Seki, Jennifer A. Jenks, Arunima Kohli, Trupti Kawli, Dorrelyn Patacsil Martin, Michael Snyder, Rosa Bacchetta, and Kari C. Nadeau. 2014. "Identification of STAT5A and STAT5B Target Genes in Human T Cells." *PLoS ONE* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086790>.
- Khalaf, Hazem, Isak Demirel, and Torbjörn Bengtsson. 2013. "Suppression of Inflammatory Gene Expression in T Cells by Porphyromonas Gingivalis Is Mediated by Targeting MAPK Signaling." *Cellular and Molecular Immunology* 10 (5): 413–22. <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.23>.
- Khouly, Ismael, Rosalie Salus Braun, Michelle Ordway, Bradley Eric Aouizerat, Iya Ghassib, Lena Larsson, and Farah Asa'ad. 2020. "The Role of DNA Methylation and Histone Modification in Periodontal Disease: A Systematic Review." *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21176217>.
- Kim, Hyunjin, Fatemeh Momen-Heravi, Steven Chen, Per Hoffmann, Moritz Kebschull, and Panos N. Papapanou. 2021. "Differential DNA Methylation and mRNA Transcription in Gingival Tissues in Periodontal Health and Disease." *Journal of Clinical Periodontology* 48 (9): 1152–64. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13504>.
- Larsson, Lena, Rogerio M. Castilho, and William V. Giannobile. 2015. "Epigenetics and Its Role in Periodontal Diseases: A State-of-the-Art Review." *Journal of Periodontology* 86 (4): 556–68. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.140559>.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." *Methods* 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Luo, Yu, Xian Peng, Dingyu Duan, Chengcheng Liu, Xin Xu, and Xuedong Zhou. 2018. "Epigenetic Regulations in the Pathogenesis of Periodontitis." *Current Stem Cell Research & Therapy* 13 (2): 144–50. <https://doi.org/10.2174/1574888X12666170718161740>.
- Martínez-García, Mireya, and Enrique Hernández-Lemus. 2021. "Periodontal Inflammation and Systemic Diseases: An Overview." *Frontiers in Physiology* 12 (October). <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.709438>.
- Monajemi, Mahdis, Shera Fisk, Yvonne C. F. Pang, Jessica Leung, Susan C. Menzies, Rym Ben-Othman, Bing Cai, Tobias R. Kollmann, Jacob Rozmus, and Laura M. Sly. 2019. "Malt1 Deficient Mice Develop Osteoporosis Independent of

- Osteoclast-intrinsic Effects of Malt1 Deficiency.” *Journal of Leukocyte Biology* 106 (4): 863–77. <https://doi.org/10.1002/JLB.5VMA0219-054R>.
- Nakajima, T., K. Ueki-Maruyama, T. Oda, Y. Ohsawa, H. Ito, G.J. Seymour, and K. Yamazaki. 2005. “Regulatory T-Cells Infiltrate Periodontal Disease Tissues.” *Journal of Dental Research* 84 (7): 639–43. <https://doi.org/10.1177/154405910508400711>.
- Nie, Jia, Yang Yang Li, Song Guo Zheng, Andy Tsun, and Bin Li. 2015. “FOXP3+ Treg Cells and Gender Bias in Autoimmune Diseases.” *Frontiers in Immunology* 6 (SEP). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00493>.
- Oliveira, Naila F. P., Gilcy R. Damm, Denise C. Andia, Cristiane Salmon, Francisco H. Nociti Jr., Sérgio R. P. Line, Ana Paula de Souza, Francisco H. Nociti, Sérgio R. P. Line, and Ana Paula de Souza. 2009. “DNA Methylation Status of the IL8 Gene Promoter in Oral Cells of Smokers and Non-Smokers with Chronic Periodontitis.” *Journal of Clinical Periodontology* 36 (9): 719–25. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01446.x>.
- Owen, David L, and Michael A Farrar. 2017. “STAT5 and CD4 + T Cell Immunity.” *F1000Research* 6: 32. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9838.1>.
- Papapanou, Panos N., Mariano Sanz, Nurcan Buduneli, Thomas Dietrich, Magda Feres, Daniel H. Fine, Thomas F. Flemmig, et al. 2018. “Periodontitis: Consensus Report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions” 89 (June): S173–82. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>.
- Parachuru, V. P. B., D. E. Coates, T. J. Milne, H. M. Hussaini, A. M. Rich, and G. J. Seymour. 2014. “Forkhead Box P3-Positive Regulatory T-Cells and Interleukin 17-Positive T-Helper 17 Cells in Chronic Inflammatory Periodontal Disease.” *Journal of Periodontal Research* 49 (6): 817–26. <https://doi.org/10.1111/jre.12169>.
- Parachuru, V. P. B., D. E. Coates, T. J. Milne, A. M. Rich, and G. J. Seymour. 2018. “FoxP3 + Regulatory T Cells, Interleukin 17 and Mast Cells in Chronic Inflammatory Periodontal Disease.” *Journal of Periodontal Research* 53 (4): 622–35. <https://doi.org/10.1111/jre.12552>.
- Prunicki, Mary, Nicholas Cauwenberghs, Justin Lee, Xiaoying Zhou, Hesam Movassagh, Elizabeth Noth, Fred Lurmann, et al. 2021. “Air Pollution Exposure Is Linked with Methylation of Immunoregulatory Genes, Altered Immune Cell Profiles, and Increased Blood Pressure in Children.” *Scientific Reports* 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83577-3>.
- Rebeaud, Fabien, Stephan Hailfinger, Anita Posevitz-Fejfar, Myriam Tapernoux, Roger Moser, Daniel Rueda, Olivier Gaide, et al. 2008. “The Proteolytic Activity of the Paracaspase MALT1 Is Key in T Cell Activation.” *Nature Immunology* 9 (3): 272–81. <https://doi.org/10.1038/ni1568>.
- Richter, Gesa M., Jochen Kruppa, H. Gencay Keceli, Emel Tuğba Ataman-Duruel, Christian Graetz, Nicole Pischon, Gunar Wagner, et al. 2021. “Epigenetic Adaptations of the Masticatory Mucosa to Periodontal Inflammation.” *Clinical*

- Epigenetics* 13 (1): 203. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01190-7>.
- Rudensky, Alexander Y. 2011. "Regulatory T Cells and Foxp3." *Immunological Reviews* 241 (1): 260–68. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01018.x>.
- Sabarish, Ram, Suresh Ranga Rao, and Vamsi Lavu. 2016. "Natural T Regulatory Cells (n Treg) in the Peripheral Blood of Healthy Subjects and Subjects with Chronic Periodontitis – A Pilot Study." *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 10 (3): ZC36–39. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15449.7446>.
- Shiau, Harlan J., and Mark A. Reynolds. 2010. "Sex Differences in Destructive Periodontal Disease: Exploring the Biologic Basis." *Journal of Periodontology* 81 (11): 1505–17. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100045>.
- Steffens, Joao Paulo, Xiaoshan Wang, Jacqueline R. Starr, Luis Carlos Spolidorio, Thomas E. Van Dyke, and Alpdogan Kantarci. 2015. "Associations Between Sex Hormone Levels and Periodontitis in Men: Results From NHANES III." *Journal of Periodontology* 86 (10): 1116–25. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.140530>.
- Takatori, Hiroaki, Hiroshi Nakajima, Koichi Hirose, Shin-ichiro Kagami, Tomohiro Tamachi, Akira Suto, Kotaro Suzuki, Yasushi Saito, and Itsuo Iwamoto. 2005. "Indispensable Role of Stat5a in Stat6-Independent Th2 Cell Differentiation and Allergic Airway Inflammation." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (6): 3734–40. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3734>.
- Tukiainen, Taru, Alexandra-Chloé Villani, Angela Yen, Manuel A Rivas, Jamie L Marshall, Rahul Satija, Matt Aguirre, et al. 2017. "Landscape of X Chromosome Inactivation across Human Tissues." <https://doi.org/10.1038/nature24265>.
- Voskuhl, Rhonda R., Amr H. Sawalha, and Yuichiro Itoh. 2018. "Sex Chromosome Contributions to Sex Differences in Multiple Sclerosis Susceptibility and Progression" 24 (1): 22–31. <https://doi.org/10.1177/1352458517737394>.
- Wang, Qian, Xinyi Zhou, Jingjing Jiang, Peng Zhang, Sisi Xia, Yi Ding, and Qi Wang. 2019. "Relationship between Serum 25-Hydroxyvitamin D3 Levels and Severity of Chronic Periodontitis in Type 2 Diabetic Patients: A Cross-Sectional Study." *Journal of Periodontal Research* 54 (6): 671–80. <https://doi.org/10.1111/jre.12669>.
- Wu, Ming, and Yan-Hui Xue. 2008. "[Main Regulatory Factors for Differentiation, Development and Function of Naturally Occurred CD4+ CD25+ Regulatory T Cells]." *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 16 (1): 207–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18315933>.
- Zhao, Ya-Qiong, Ying-Hui Zhou, Jie Zhao, Yao Feng, Zheng-Rong Gao, Qin Ye, Qiong Liu, et al. 2021. "Sex Variations in the Oral Microbiomes of Youths with Severe Periodontitis." *Journal of Immunology Research* 2021 (October): 1–16. <https://doi.org/10.1155/2021/8124593>.
- Zhu, Ling, Lei Jia, Zhongwei Liu, Yong Zhang, Junkui Wang, Zuyi Yuan, and Rutai Hui. 2019. "Elevated Methylation of FOXP3 (Forkhead Box P3)-TSDR (Regulatory T-Cell-Specific Demethylated Region) Is Associated with Increased Risk for Adverse

Outcomes in Patients with Acute Coronary Syndrome.” *Hypertension* 74 (3): 581–89. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12852>.

Zhu, Xiaohua, Qiang Chen, Zhiqiang Liu, Daya Luo, Lan Li, and Ying Zhong. 2020. “Low Expression and Hypermethylation of FOXP3 in Regulatory T Cells Are Associated with Asthma in Children.” *Experimental and Therapeutic Medicine* 19 (3). <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8443>.

Table 1 Assays used for evaluation of methylation

Assay	Catalog number (QIAGEN Sciences)	CpGs Island Location
MALT1	EPHS106651-1A	Chr18: 56338211 - 56339277
LTB	EPHS112342-1A	Chr6: 31548436 - 31549277
STAT5A	EPHS106010-1A	Chr17: 40440188 - 40441014
FOXP3	EPHS115010-1A	ChrX: 49125645 - 49127200

Table 2 Assays used for evaluation of transcription.

Assay	ID (Applied Biosystems)	Chromossome Location
MALT1	Hs01120060_m1	Chr.18: 58671386 - 58753806
LTB	Hs00242739_m1	Chr.6: 31580558 - 31582425
STAT5A	Hs00559643_m1	Chr.17: 42287547 - 42311943
FOXP3	Hs01085834_m1	Chr.X: 49250436 - 49266505
ACTB	Hs01060665_g1	Chr.7: 5527148 - 5530601

Table 3 Demographic data and clinical parameters of study population

	Control (n=30)	Periodontitis (n=30)	P value
Age (years) mean±SD	37,96±8,29	38,48±8,72	0,904
Male(n)	15(50%)	15(50%)	-
Female (n)	15(50%)	15(50%)	-
PD (mm) mean±SD	1,8±0,76	7,7±2,21	<0,001
CAL (mm) mean±SD	1,9±0,80	9,0±2,88	<0,001
Alveolar bone loss	No	Yes	-

Figure 1 Methylation profile of the panel of genes related to cytokine production.



Figure 2 A-D: Methylation percentage profile of selected genes. A ($p=0,005$); B ($p=,004$); C ($p=0,015$); D ($p=0,376$). E, F: Methylation percentage profile of STAT5A (A) and FOXP3 (B) by sex. C(m): control male group; C(f): control female group; P(m): periodontitis male group; P(f): periodontitis female group. E ($p=0,024$); F (C(m)x P(m) $p=0,037$; C(m) x C(f) $p=0,002$). (*) represents the statistical differences

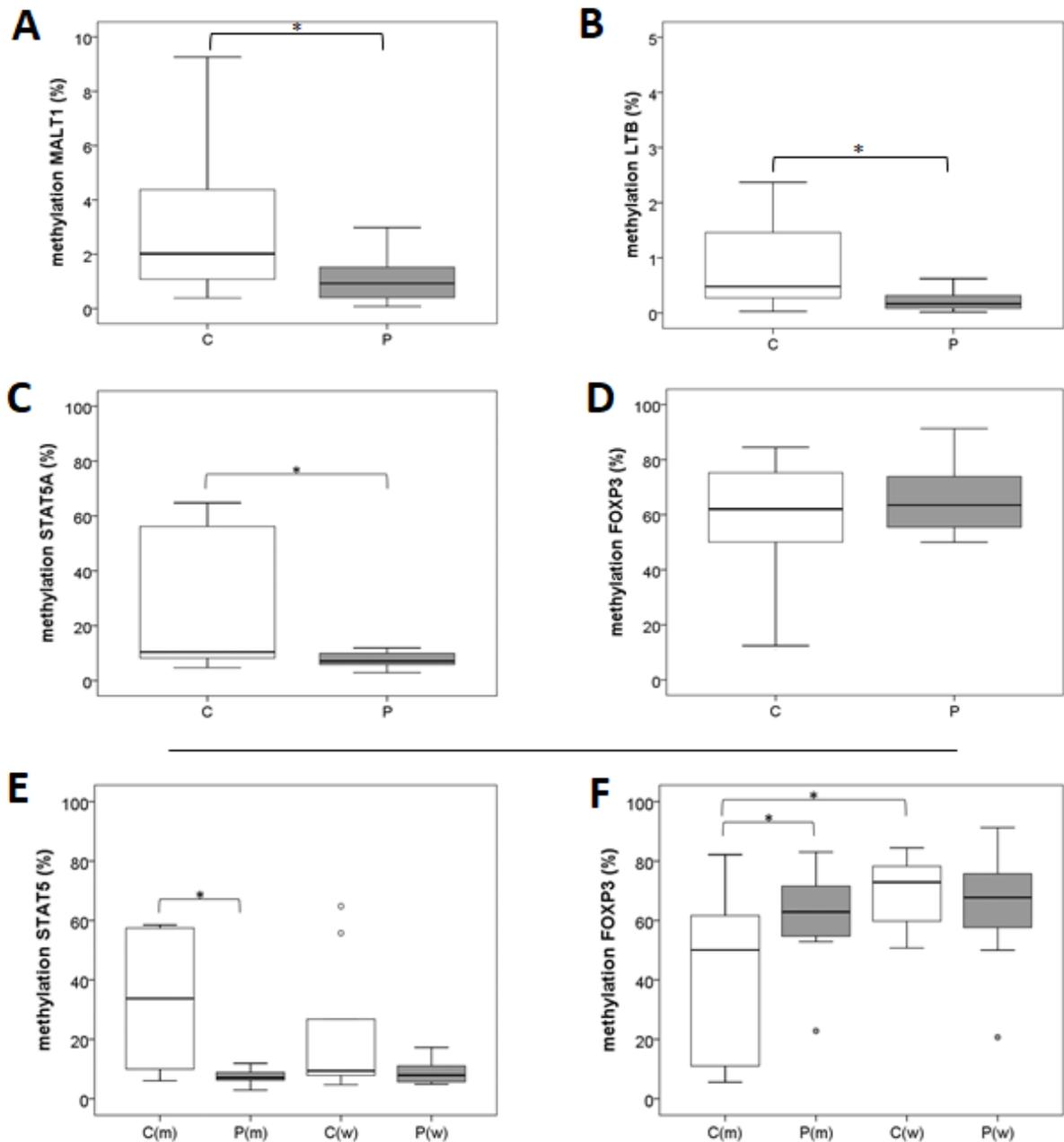


Figure 3 A-D: Transcription of mRNA of selected genes. No statistical differences were seen between groups. E, F: Transcription levels of STAT5A (E) and FOXP3 (F) by sex. C(m): control male group; C(f): control female group; P(m): periodontitis male group; P(f): periodontitis female group. (*) correspond to statistical differences. F (C(m)x P(m) $p=0,037$; P(m) x P(f) $p=0,047$).

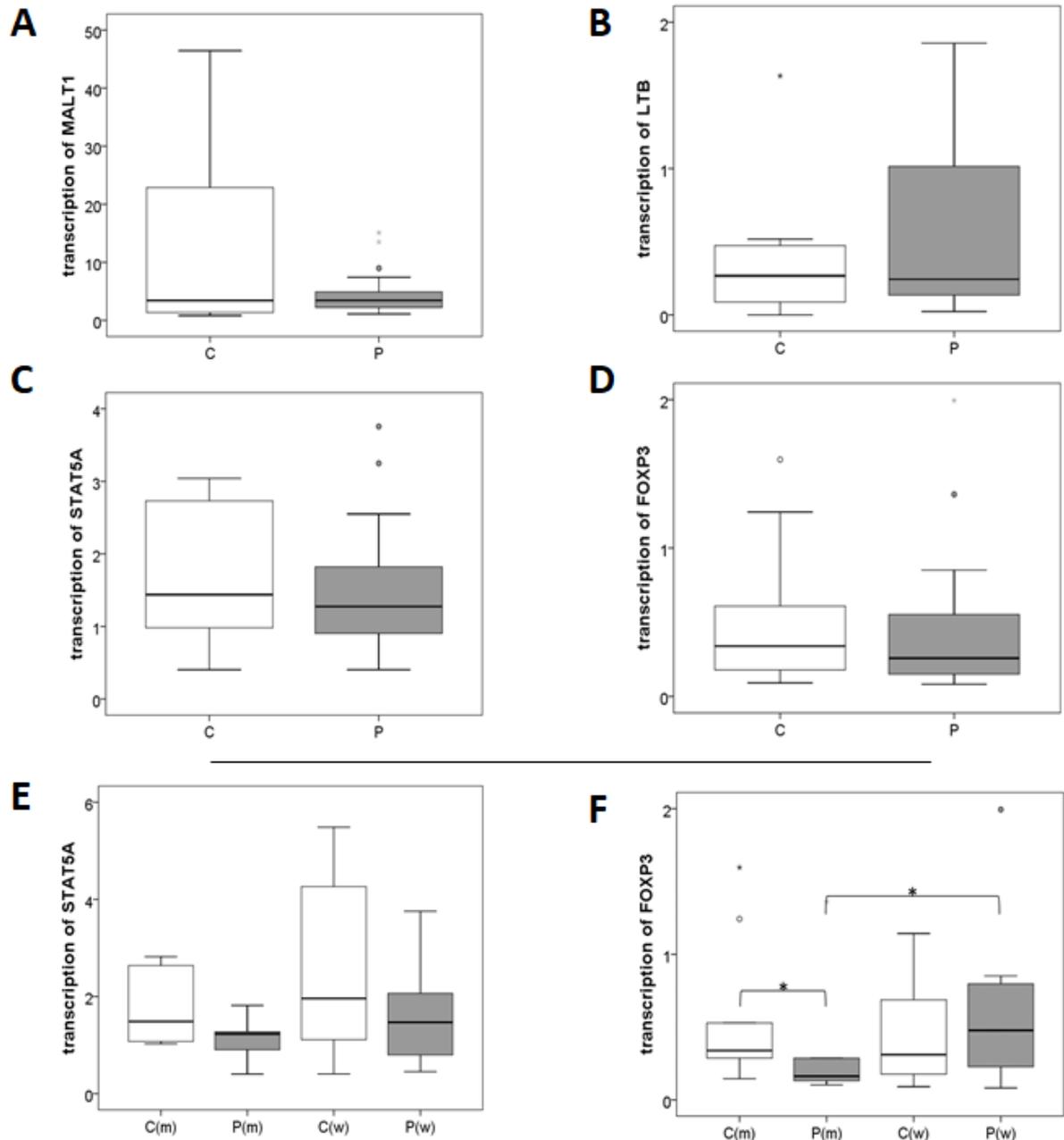
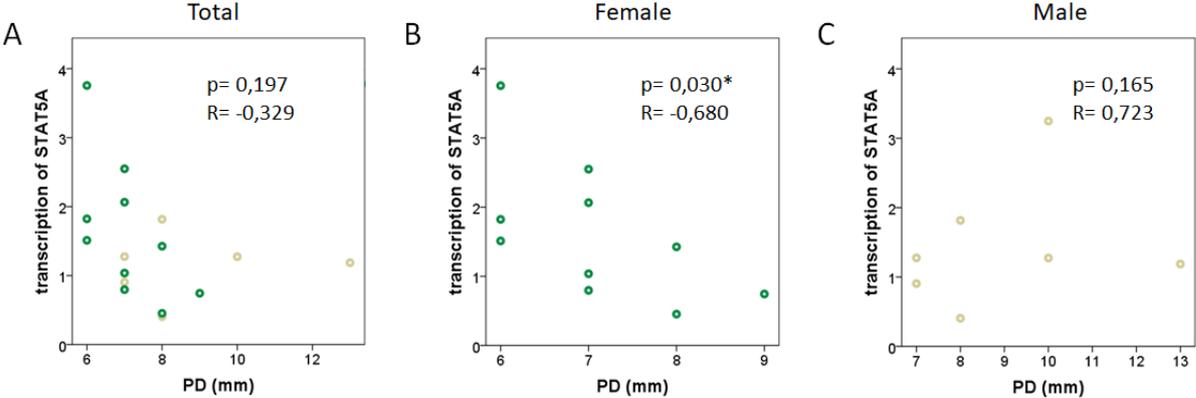


Figure 4 Correlation between transcription levels of STAT5A and clinical parameter in P group.



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: **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 3409-4592