

SIMONE ANGÉLICA DE FARIA AMORMINO CARVALHO

Avaliação do padrão de metilação dos genes *CD14* e *NFkB*
e transcrição das DNAs metiltransferases na Periodontite
Crônica

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Junho/2016

SIMONE ANGÉLICA DE FARIA AMORMINO CARVALHO

Avaliação do padrão de metilação dos genes *CD14* e *NFκB*
e transcrição das DNAs metiltransferases na Periodontite
Crônica

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 Doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Paula Rocha Moreira

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Junho/2016

”Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o que você faz
com aquilo que você sabe.”

Aldous Huxley

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao Padre Eustáquio, que se mostraram presentes nos momentos difíceis e me ajudou a superá-los com firmeza e sabedoria. E iluminaram meu caminho onde encontrei pessoas maravilhosas.

A minha mãe e ao meu sempre presente pai, por serem meu porto seguro, pelo apoio sem medida e pelo exemplo de ética e profissionalismo. Amo muito vocês!!!

A minha filha Letícia por todo seu amor e pelo seu sorriso mais lindo, que faz com que minha vida tenha muito mais sentido.

Aos meus irmãos Raquel, Alexandre e Patrícia pelo incentivo e carinho e aos meus sobrinhos lindos Gustavo, Manuela, Guilia, Mateus e Rafa que fazem tudo valer a pena.

Ao meu marido Olivério pela compreensão e paciência em minhas ausências e por me fazer querer ser uma pessoa melhor. E por apoiar e estar presente em todas as minhas decisões.

A Professora Walderez Ornela Dutra e o Professor Ricardo Santiago Gomez, por todo apoio e infraestrutura disponibilizada nos Laboratórios de Biologia das Interações Celulares e Biologia Molecular da UFMG

Ao meu querido amigo e eterno IC Luis Paulo Rocha por toda ajuda e disponibilidade que possibilitaram a realização dessa tese.

A Telma Cristina Arão por toda paciência e ensinamentos importantes para a construção desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia das Interações Celulares, por tornarem meus dias mais alegres e disponibilidade de me ajudar sempre.

Aos mestres presentes no laboratório, que sempre de alguma forma me deram apoio nessa vida acadêmica, Micena, Juliana Estanislau e Rodolfo Giunchetti.

A todos os meus amigos que compreenderam a minha ausência.

Aos meus colegas de trabalho do Centro de Especialidade Odontológica de Venda Nova, em especial a Vânia e a Eva, e a todos que me ajudaram direta ou indiretamente a conquistar mais uma etapa.

A todos os pacientes envolvidos na pesquisa e que permitiram a realização desse estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo apoio financeiro.

E agradeço especialmente a minha querida orientadora Paula Rocha Moreira, por todas as oportunidades e confiança ao longo de todo o percurso e pelos ensinamentos compartilhados. Agradeço muito pela oportunidade!!!

A todos muito obrigado por fazerem parte dessa história

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença periodontal.....	1
1.1.1 Considerações gerais e patogênese.....	1
1.1.2 Microbiologia da doença periodontal	3
1.2 CD14	5
1.3 <i>NFκB</i>	8
1.4 Epigenética.....	11
1.4.1 Metilação do DNA.....	12
1.4.1.1 Fatores moduladores da metilação	17
1.4.1.2 Metilação e doença periodontal.....	20
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 METODOLOGIA	25
3.1 Considerações Éticas	25
3.2 Metodologia	25
3.2.1 Grupos amostrais.....	25
3.2.1 Coleta das amostras.....	27
3.2.2 Avaliação histológica	27
3.2.3 Extração e Quantificação do DNA	27
3.2.4 Avaliação do padrão de metilação do DNA.....	28
3.4.5 Extração e quantificação do RNA	28
3.4.6 Transcrição Reversa – Síntese de DNA complementar (cDNA)	29
3.4.7 Reação em Cadeira da Polimerase em Tempo Real (qPCR)	29
3.6 Análises Estatísticas.....	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Parâmetros clínicos e demográficos da população	31

4.2	Avaliação histológica.....	32
4.3	Gene <i>CD14</i>	32
4.3.1	Metilação de <i>CD14</i>	32
4.3.2	Gene <i>NFkB</i>	38
4.3.2.1	Metilação do <i>NFkB</i>	38
4.3.3	Genes <i>DNMTs</i>	41
4.3.3.1	DNMT1	41
4.3.3.2	DNMT3A	42
4.3.3.3	DNMT3B	45
5.	DISCUSSÃO	48
6.	CONCLUSÕES	53
7.	REFERÊNCIAS	54
8.	ANEXOS	70
9.	APÊNDICES.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Patogênese da doença periodontal, modelo baseado em Page e Kornman, 1997.....	3
Figura 2	Complexos microbianos.....	4
Figura 3	Representação esquemática da ligação do LPS ao complexo CD14/TLR-4/MD2 que promove a ativação final do NF- κ B e expressão de genes pró-inflamatórios.....	6
Figura 4	Vias de ativação do NF κ B.....	10
Figura 5	Esquema do processo de formação da 5-Metilcitosina (5-MeC) pela DNA metiltransferase.....	13
Figura 6	Padrão de metilação do gene <i>CD14</i> nos grupos periodontite crônica (A) e controle (B), considerando indivíduos não fumantes...	33
Figura 7	Padrão de metilação do gene <i>CD14</i> nos grupos periodontite crônica (A) e controle (B), considerando indivíduos não fumantes...	33
Figura 8	Percentual de hipometilação do gene <i>CD14</i> no grupo controle não fumante e fumante.....	34
Figura 9	Correlação negativa entre o percentual de hipometilação e número de células inflamatórias no grupo periodontite crônica não fumante.....	35
Figura 10	Comparação do nível de transcrição do <i>CD14</i> entre os grupos periodontite crônica e controle em não fumantes.....	36
Figura 11	Correlação positiva entre expressão de <i>CD14</i> e número de células inflamatórias no grupo de periodontite não fumante.....	36
Figura 12	(A) Análise do nível de transcrição do <i>CD14</i> no tecido gengival do grupo controle não fumante e fumante. (B) Análise do nível de transcrição do <i>CD14</i> no tecido gengival do grupo de periodontite crônica não fumante e fumante.....	37
Figura 13	Padrão de metilação do gene <i>NFκB</i> nos grupos periodontite crônica (A) e controle (B), considerando indivíduos não fumantes...	38
Figura 14	Padrão de metilação do gene <i>NFκB</i> nos grupos periodontite crônica (A) e controle (B), considerando indivíduos fumantes.....	39
Figura 15	Comparação do nível de transcrição do <i>NFκB</i> entre os grupos periodontite crônica e controle em não fumantes.....	40
Figura 16	(A) A expressão dos níveis de DNMT1, no grupo de periodontite e controle não fumante ao comparar ao controle endógeno da reação RPLPO. (B) A expressão dos níveis de DNMT1, no grupo de periodontite e controle fumante ao comparar ao controle	

	endógeno da reação RPLPO.....	41
Figura 17	Correlação negativa entre os níveis de transcrição de DNMT1 e número de células inflamatórias no grupo periodontite crônica não fumante.....	42
Figura 18	(A) A expressão dos níveis de DNMT3A, no grupo de periodontite e controle não fumante ao comparar ao controle endógeno da reação RPLPO. (B) A expressão dos níveis de DNMT3A, no grupo de periodontite e controle fumante ao comparar ao controle endógeno da reação RPLPO.....	43
Figura 19	Expressão de DNMT3A no grupo periodontite considerando o tabagismo.....	44
Figura 20	Correlação positiva entre os níveis de transcrição da DNMT3a e a profundidade de sondagem no grupo de periodontite crônica não fumante.....	45
Figura 21	(A) A expressão dos níveis de DNMT3B, no grupo de periodontite e controle não fumante ao comparar ao controle endógeno da reação RPLPO. (B) A expressão dos níveis de DNMT3B, no grupo de periodontite e controle fumante ao comparar ao controle endógeno da reação RPLPO.....	45
Figura 22	Expressão de DNMT3B no grupos periodontite crônica (A) e controle (B), considerando o tabagismo.....	46
Figura 23	Correlação positiva entre níveis de transcrição da DNMT3B e o nível de inserção clínica no grupo de periodontite crônica não fumante.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros clínicos e demográficos.....	31
----------	-----------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
C	Citosina
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar
CD14m	CD14 da membrana plasmática
CD14s	CD14 solúvel
CpG	Citosina/ ligação fosfodiéster/ guanina
COX	Cicloxigenase
°C	Grau Celso
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
BAFF	Cell activatingfactor receptor
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DNMT	DNA metiltrasnferase
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
G	Guanina
IFN γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Metilado
μ L	Microlitro
ml	Mililitro
MOD	Minimal oligomerization domain
MyD88	Fator 88 de diferenciação mieloide
Nf κ B	Fator de Transcrição Nuclear κ Beta
NEMO	NF κ B essencial modulator
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NIC	Nível de inserção clínica
Ng	Nanograma
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógenos
PB	Pares de base
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PGE2	Prostaglandina E2
Primers	Oligonucleotídeo iniciador
PS	Profundidade de sondagem
qPCR	Reação em Cadeia da polimerase em tempo Real
RHD	Rel homology domain
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	Rotação por minuto
SAH	S-adenosilcisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SS	Sangramento a sondagem
T	Timina
<i>Taq</i>	DNA polimerase da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TLR	Receptor Toll-Like
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
U	Não metilado
UM	Metilação parcial

RESUMO

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético catalisado por uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs). Este evento é capaz de interferir na expressão de vários genes envolvidos na resposta imune e tem sido relacionado à patogênese de doenças inflamatórias, como a periodontite. CD14 é um receptor com alta afinidade pelo LPS e ao se ligar a ele, promove uma cascata de sinalização intracelular com ativação do NFκB e consequente expressão de genes pró-inflamatórios. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar o padrão de metilação e a transcrição dos genes *CD14* e *NFκB*, assim como a transcrição das enzimas DNMTs na periodontite crônica. A influência do tabagismo foi avaliada nestes eventos. Amostras gengivais foram coletadas de 30 indivíduos com periodontite crônica e 30 sem periodontite e submetidas à análise histológica. O DNA foi extraído pelo kit QIAamp DNA Tissue Mini Kit e analisado utilizando o Methyl Profiler DNA Methylation qPCR, com posterior análise por PCR em tempo real. Para a avaliação da transcrição, foi realizada a extração do RNA pelo método do trizol, seguida da conversão em cDNA e posterior análise por PCR em tempo real com sondas específicas. Um padrão de DNA não metilado do CD14 foi observado em todos os grupos analisados. A transcrição de CD14 foi maior no grupo periodontite comparado ao controle. Um padrão de DNA não metilado do NFκB também foi um evento usual nos tecidos gengivais dos indivíduos com e sem periodontite. Maior transcrição de NFκB foi verificada no grupo sem periodontite comparado ao com periodontite, considerando os não fumantes. Não houve diferença na transcrição da DNMT1 em todos os grupos avaliados. Os indivíduos com periodontite crônica e fumante apresentaram maior expressão da DNMT3A e DNMT3B que os não fumantes. DNMT3A e B foram correlacionadas com parâmetros de gravidade da doença periodontal. Os resultados mostraram pela primeira vez que o padrão hipometilado dos genes CD14 e NFκB é um evento comum nos tecidos periodontais. Além disso, os dados sugerem o fumo pode interferir na transcrição de CD14 e das DNMT3A e B. Estudos adicionais são necessários para determinar a relevância funcional dessas alterações na periodontite.

ABSTRACT

DNA methylation is an epigenetic mechanism catalyzed by a family of enzymes called DNA methyltransferases (DNMTs). This event is able to interfere with the expression of several genes involved in immune response and has been related to the pathogenesis of inflammatory diseases, like periodontitis. CD14 is a receptor with high affinity for LPS and this interaction promotes a cascade of intracellular signaling with NFkB activation and consequent expression of pro-inflammatory genes. The objectives of this study were to assess the pattern of methylation and transcription of CD14 and NFkB genes, as well as the transcription of DNMT on chronic periodontitis. The influence of smoking was evaluated in these events. Gingival tissue samples were collected from 30 individuals with chronic periodontitis and 30 without periodontitis and submitted to histological analysis. The DNA was extracted by the QIAamp DNA Tissue kit Mini Kit and analyzed using the Methyl DNA Methylation qPCR Profiler. For the evaluation of transcription RNA extraction was performed by the method of trizol, followed by conversion to cDNA and further analysis by real-time PCR with specific probes. An unmethylated pattern was observed in all groups. The CD14 transcription was higher in periodontitis compared to control. The unmethylation of NFkB was also a usual event in gingival tissues from individuals with and without periodontitis. Increased transcription of NFkB was observed in the group without periodontitis compared to with periodontitis, considering the non-smokers. There was no difference in transcription of DNMT1 in all evaluated groups. Individuals with chronic periodontitis and smoker presented a higher expression of DNMT3A and DNMT3B than nonsmokers. DNMT3A and B were correlated with severity of periodontal disease. The results showed for the first time an unmethylated pattern of the CD14 and NFkB genes as a common event in periodontal tissues. In addition the data suggest that the smoking can interfere in transcription of CD14 and DNMT3A/B. Additional studies are needed to determine the functional relevance of these changes on periodontitis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença periodontal

1.1.1 Considerações gerais e patogênese

A doença periodontal tem etiologia multifatorial e é uma infecção polimicrobiana, caracterizada pela inflamação dos tecidos de suporte e inserção dos dentes. O termo doença periodontal abrange a gengivite e a periodontite. A gengivite é o processo inflamatório restrito ao periodonto de suporte (gengiva) e é reversível com a remoção do fator etiológico. É considerada a forma mais comum de doença periodontal, devido a sua alta prevalência na população de todas as faixas etárias (Armitage, 1996).

A doença periodontal inicia - se como uma gengivite, ocasionada pelo acúmulo de biofilme e é seguida por uma interação complexa entre bactérias periodontopatogênicas, fatores ambientais e a resposta imune do hospedeiro. Esta interação pode envolver os tecidos de inserção periodontal, desenvolvendo então a periodontite (Bartold *et al.*, 2000).

A periodontite é caracterizada pela inflamação no periodonto de inserção (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar). É uma doença destrutiva devido à perda de inserção clínica e do osso alveolar detectável radiograficamente, formação de bolsa periodontal e inflamação gengival (Kinane, 2001). A predisposição à doença varia consideravelmente entre indivíduos e é influenciada por uma série de fatores (Albandar, 2002).

A Academia Americana de Periodontia, em 1999, classificou a periodontite em dois grupos principais, a periodontite crônica e a agressiva. A periodontite crônica é a forma de periodontite mais comum. Em geral, ocorre em pacientes com idade acima de 30 anos, entretanto pode ocorrer em qualquer faixa etária. É caracterizada por substancial depósito de biofilme e cálculos associados com a presença de inflamação gengival, bolsa periodontal e perda de inserção. A doença apresenta uma taxa de progressão lenta a moderada, podendo apresentar períodos de rápida progressão. Pode estar

associada aos fatores locais, ser modificada ou estar associada aos fatores sistêmicos, e ser alterada por fatores comportamentais (Armitage, 1999).

A periodontite agressiva é menos prevalente que a crônica e afeta principalmente indivíduos jovens, com menos de 30 anos. A quantidade de depósitos de biofilme e cálculos é incompatível com o grau de destruição periodontal, a taxa de progressão é rápida e há uma tendência de agregação familiar (Armitage, 1999).

A inflamação no tecido periodontal é uma resposta do hospedeiro suscetível aos microrganismos do biofilme e seus produtos, que estão em constante contato com o epitélio sulcular e juncional (Offenbacher, 1996; Schenkein, 2006). A resposta do hospedeiro à infecção depende da natureza e da virulência dos patógenos, resposta imunológica, tabagismo, fatores genéticos e epigenéticos (Kornman, 2008).

As características clínicas das diferentes formas de periodontite se devem a interação do patógeno com o hospedeiro susceptível descrito por Page e Kornman (1997). De acordo com os pesquisadores, a infecção microbiana, a resposta imune inflamatória do hospedeiro, o metabolismo dos tecidos conjuntivo e ósseo e os sinais clínicos da doença podem ser visualizados como compartimentos associados (Figura 1). A infecção bacteriana, representada na forma de fatores de virulência, induz uma resposta imunoinflamatória do hospedeiro. O resultado dessa interação determina se a doença irá paralisar ou progredir, uma vez que uma resposta efetiva do hospedeiro poderá levar ao controle do desafio microbiano ou causar uma inflamação mais leve. Por outro lado, uma resposta insuficiente ou desregulada, afeta o metabolismo dos tecidos ósseo e conjuntivo, aumentando a produção de mediadores inflamatórios, gerando efeito deletério sobre os tecidos e perda de tecido de inserção. Os sinais clínicos da doença formam um novo microambiente, a bolsa periodontal. Os microrganismos que se adaptam a esse ambiente são bactérias que representarão um novo desafio microbiano.

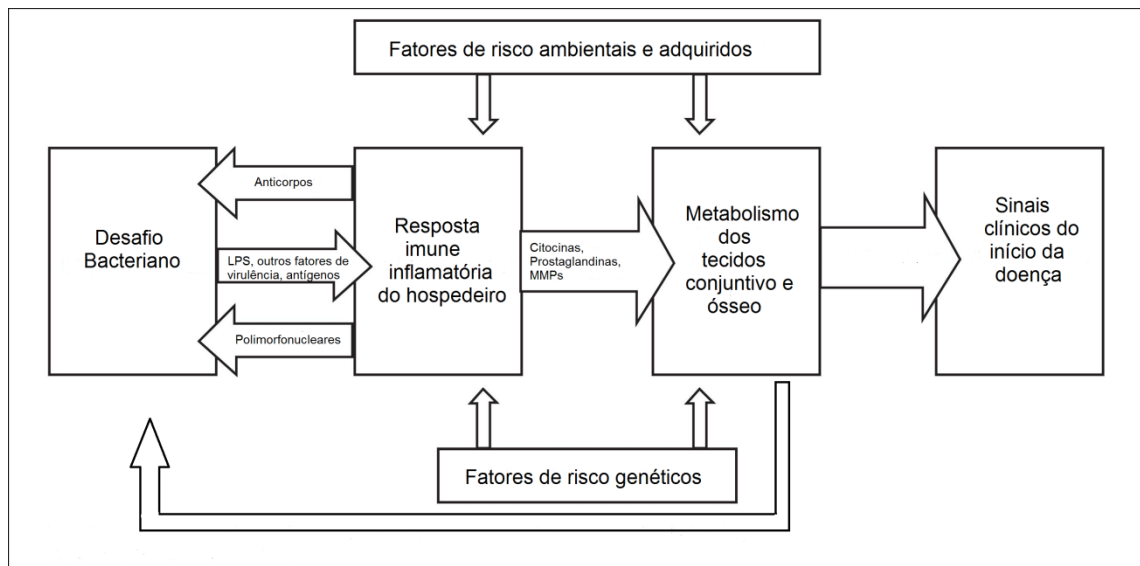


Figura 1: Patogênese da doença periodontal, modelo baseado em Page e Kornman, 1997.

1.1.2 Microbiologia da doença periodontal

A demonstração da natureza infecciosa da doença periodontal foi verificada pelo trabalho de Løe e colaboradores, observando a relação entre placa bacteriana e a inflamação gengival (Løe *et al.*, 1965). Estima-se que há aproximadamente 750 espécies diferentes de microrganismos na cavidade bucal (Kazor *et al.*, 2003), porém apenas uma parte delas é considerada periodontopatogênica (Haffajee e Socransky, 1994).

Socransky *et al.* (1998) observaram as associações entre 40 espécies bacterianas presentes na microbiota subgengival de indivíduos com periodontite crônica. Foram definidos cinco complexos bacterianos de acordo com as similaridades por pares e grupos de espécies (Figura 2). O complexo vermelho é composto por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*) e *Treponema denticola*. O complexo laranja, que se mostrou fortemente associado ao complexo vermelho, foi dividido em dois grupos: um grupo composto por *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Micromonas micros* (*Peptostreptococcus micros*); e outro grupo formado pelas espécies: *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Streptococcus constellatus*. O complexo verde é composto por *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*,

Campylobacter concisus, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sorotipo a. O complexo amarelo formado por um grupo de estreptococos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguis*), *Streptococcus oralis*; e o complexo roxo, que inclui *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. As espécies *Selenomonas noxia* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sorotipo b não se correlacionaram com nenhuma outra. As cepas que compõem o complexo vermelho foram fortemente associadas ao sangramento durante a sondagem e às bolsas mais profundas (Socransky *et al.*, 1998). Posteriormente, algumas espécies de actinomicetos (*Actinomyces gerencseriae*, *A. israelii*, *A. naeslundii* 1 e *A. naeslundii* 2) foram agrupadas no complexo azul (Socransky e Haffajee, 2002).

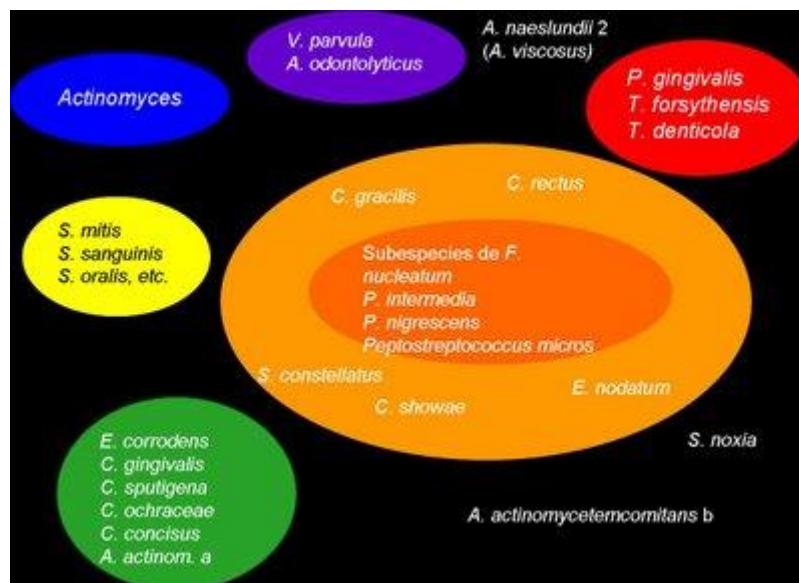


Figura 2: Complexos microbianos
Fonte: Socransky & Haffajee, 2002

Os microrganismos periodontopatogênicos são em geral Gram-negativos, anaeróbios e, menos frequentemente, microaerófilos (Socransky, 1970; Haffajee e Socransky, 1994). Essas bactérias são capazes de promover uma degradação dos tecidos periodontais, por meio da liberação de uma variedade de produtos biologicamente ativos, como lipopolissacarídeos (LPS), ácidos orgânicos, peptídeos quimiotáxicos e toxinas protéicas (Offenbacher, 1996).

Fatores microbiológicos causam destruição periodontal indiretamente, em decorrência da ativação de vários componentes do sistema de defesa do hospedeiro (Ishikawa, 2007). O sistema imune inato é capaz de reconhecer produtos microbianos conservados e estes são reconhecidos por um conjunto de receptores, incluindo CD14 e *Toll like receptors* (TLRs). Esses receptores ativam uma cascata de resposta imunológica que promovem a ativação do Fator de ativação nuclear kB (NFkB) e a liberação de mediadores inflamatórios (Aderem e Ulevicht2000; Hornfef e Bodgan 2005).

1.2 CD14

O receptor CD14 é uma glicoproteína de aproximadamente 55KDa expressa na superfície de monócitos maduros, macrófagos e neutrófilos ativados (Kielian e Blecha, 1995). O gene do receptor *CD14* localiza-se no cromossomo 5q – região q23-21, consiste de aproximadamente 3900 pares de bases estruturadas em dois exons e codifica uma proteína rica em leucina (Koppelman *et al.*, 2001).

O CD14 de membrana (CD14m) é um receptor que tem alta afinidade pelo LPS bacteriano. Após ser liberado a partir de bactérias, o LPS se liga inicialmente a uma proteína do plasma denominada LBPe esse complexo se liga ao CD14 (Kielian e Blecha, 1995). O CD14m não apresenta domínio de sinalização intracelular, necessitando assim de moléculas co-receptoras como o TLR-4 (Jiang *et al.*, 2005). Associado ao TLR-4 e MD-2, o CD14 forma uma multiproteína receptora de LPS (LPS/CD14/TLR-4/MD-2) e via MyD88, TIRAP e TRAF6 promove a ativação do NFkB e consequente expressão de genes pró-inflamatórios (Aderem e Ulevich, 2000) (Figura3).

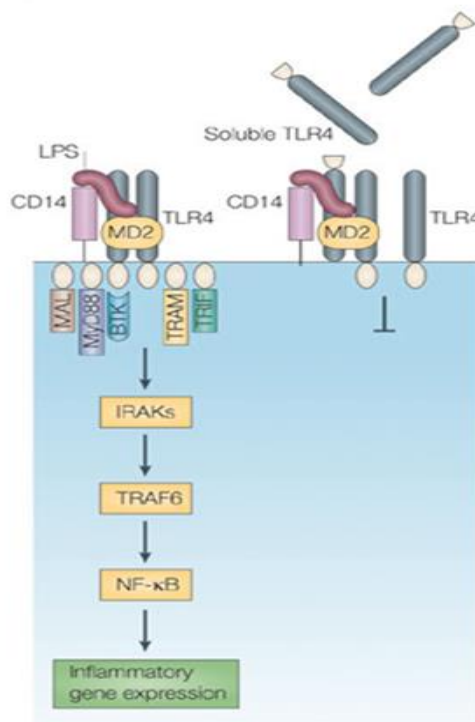


Figura 3: Representação esquemática da ligação do LPS ao complexo CD14/TLR-4/MD2 que promove a ativação final do NF- κ B e expressão de genes pró-inflamatórios. Fonte: Fo *et al.*, 2005

O CD14 também ocorre na forma solúvel (CD14s) e é detectado na saliva, urina, soro e fluido crevicular gengival. Ele é um pouco menor que o CD14m e acredita-se ser o resultado de uma clivagem do CD14m por proteases ou fosfolipases específicas (Bazil *et al.*, 1989). O CD14s diminui a atividade induzida pela endotoxina através da competição pelo LPS com o CD14m e também aumenta a resposta ao LPS em células que não apresenta receptor em sua superfície, como células endoteliais, epiteliais e musculatura lisa (Bas *et al.*, 2004).

Alterações na expressão de CD14 têm sido associadas a doenças infecciosas inflamatórias (Le Van, *et al.*, 2001). Essas mudanças têm sido estudadas em condições como septicemia (Dahmer *et al.*, 2005), doenças do coração (Arroyo-Espliguero, *et al.*, 2004), doenças alérgicas (Munthe-Kass *et al.*, 2010) e na doença periodontal (Hayashi *et al.*, 1999; Nicu *et al.*, 2009; Raunio *et al.*, 2009).

Estudos apontam que elevados níveis de CD14s tem sido detectados em soros de pacientes com periodontite e esse nível diminui após o tratamento periodontal adequado (Raunio *et al.*, 2009; Hayashi *et al.*, 1999; Nicu *et al.*, 2009). Animais com deficiência na expressão do gene CD14 são hiporresponsivos ao LPS e sobrevivem aos efeitos letais, porém respondem com sinais de endotemia quando expostos a altas doses (Haziot *et al.*, 1996).

Alterações genéticas e epigenéticas podem influenciar a expressão gênica e tornar o indivíduo mais suscetível ao desenvolvimento e progressão de doenças. Em relação ao gene CD14, o polimorfismo genético-260 (C/T) na região promotora do gene tem sido relacionado ao aumento da expressão de CD14 e há indícios da associação deste polimorfismo com a suscetibilidade às doenças periodontais (Mauro *et al.*, 2005; Tervonen *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2013).

Na literatura há poucos trabalhos que mostram a relação da epigenética com o gene CD14. Schaubert *et al.*, (2008) mostraram que a expressão de CD14 nos ceratinócitos pode ser influenciada por modificações epigenéticas promovendo alteração da função microbiana e da resposta imune inata na pele. Munthe-Kass *et al.* (2010) avaliaram crianças do nascimento aos dez anos de idade para verificar a relação entre metilação do gene *CD14* e a asma brônquica. Os resultados mostraram que houve um aumento da metilação nas crianças entre dois e dez anos de idade, e o nível de metilação foi inversamente proporcional com o nível de expressão. Slatts *et al.* (2012) avaliaram o padrão de metilação no promotor do gene CD14 em amostras de placentas e concluíram que o fato de “viver em fazendas” promove uma regulação epigenética do gene *CD14* prevenindo o desenvolvimento de alergias nas mulheres.

1.3 NFkB

O NFkB foi descoberto inicialmente em linfócitos T como regulador da transcrição da cadeia da k-imunoglobulina, entretanto está presente em todas as células de mamíferos (Nabel e Baltimore, 1987). NFkB apresenta aproximadamente 968 aminoácidos e está localizado na região 4q24 do gene. É uma molécula pleiotrópica, com participação na regulação e na indução da expressão gênica, desempenha papel essencial na resposta imunológica e inflamatória (Li *et al.*, 2002; Senftleben, 2003; Xiao 2004) e também atua na proliferação celular e apoptose (Xiao, 2004).

A família do NFkB contém cinco subunidades: p65 (RelA), c-Rel, RelB, NF-kB1 (p50) e NFkB2 (p52). Essas proteínas estruturalmente homólogas formam homodímeros e heterodímeros para formar dímeros ativadores (p50-p-65) ou repressores (p50-p50 e p-52-p-52) via porção N-terminal. Essa porção é bem conservada com cerca de 300 aminoácidos (RHD – Rel homology domain), que se dividem em uma região de domínio de dimerização, onde há um sinal de localização nuclear, e outra que se liga ao Ácido Desoxirribonucleico (DNA) (Hayden e Ghosh, 2008). A região C-terminal é diferente em cada subunidade, o p65, c-Rel e RelB tem domínio de transativação, que é necessária para iniciar a atividade transcricional (Meffert e Baltimore, 2005). As subunidades formam dímeros ativadores (p50-p65) ou repressores (p50-p50 e p52-p52)(Meffert e Baltimore, 2005).As subunidadesse encontram no citoplasma da maioria das células, complexadas com as proteínas inibitórias da família kappa Bs - Inhibitory kappa B: IκBa, IκBβ, IκBe, IκB-R, IκBγ(p105), IκBδ(p100) e Bcl-3. O heterodímero p-50-p65 é o mais abundante da família do NFkB e em sua maioria está associado ao IκBa(Malek *et al.*, 2007).

Há duas vias de ativação do NFkB: a clássica (via canônica) e alternativa (via não canônica) (Figura 4). A via clássica é a mais comum e está associada à expressão de genes relacionados ao processo inflamatório, a resposta imunológica inata, a anti apoptose e a sobrevivência celular (Xiao *et al.*, 2004). Para que ocorra a ativação do NFkB, IκB é fosforilado no resíduo de

serina pelo complexo de proteína quinase IKK. Essa fosforilação é o sinal para a ubiquitinação e posterior degradação do I κ B pelo proteassoma. No citoplasma, um conjunto de proteínas adaptadoras e ancoradoras (TRAFs, MyD88 e TIRAP) e quinases (RIP, IRAK) formam um complexo quando há um estímulo, facilitando o recrutamento da IKK. Após a degradação do I κ B, os dímeros do NF- κ B (por ex. p50-p65) são liberados e migram para o núcleo onde atuarão na regulação da transcrição de genes específicos (Kaltschmidt et al., 2005).

O complexo IKK contém duas subunidades catalíticas denominadas IKK α (IKK1) e IKK β (IKK2) e uma subunidade não catalítica denominada NEMO (NF- κ B essential modulator). Existem diversas combinações entre as subunidades do IKK, podendo ser homo ou heterodímeros de IKK α ou IKK β , associados ou não ao NEMO (Mercurio *et al.*, 1999). O mais comumente encontrado é IKK α -IKK β -NEMO (Scheidereit, 2006).

Esta via é ativada por uma variedade de sinais inflamatórios, incluindo citocinas próinflamatórias e endotoxinas bacterianas, que leva a ativação do complexo IKK. Este fosforila o I κ B α em uma maneira dependente de IKK β -NEMO. O NEMO é uma subunidade regulatória do complexo IKK que possui um domínio MOD (minimal oligomerization domain) e um domínio de ligação à ubiquitina (UDB, ubiquitin-binding domain) associado ao MOD, essencial para a ativação do processo (Xiao *et al.*, 2004).

A via alternativa está associada à expressão de genes que atuam no desenvolvimento e manutenção de órgão linfóides secundários (linfonodos, baço, tonsilas e placas de Peyer) (Alcama *et al.*, 2002). Essa via é ativada pelo conjunto de receptores da família do TNF (fator de necrose tumoral), que incluem receptores de linfotoxina β (LT β R), BAFF (B cell activating factor receptor), RANK (receptor activator of NF κ B) e CD40L (Ramakrishnan et al., 2004). Esta ativação é mediada pela quinase NIK (NF- κ B-inducing kinase) que sinaliza para o homodímero IKK α fosforilar a p100 que está associada à RelB. Este é um sinal para que a p100 seja ubiquitinada e degradada. O proteassoma degrada somente a porção C-terminal, deixando a porção N-terminal para formar o peptídeo p52. O dímero formado p52-RelB desloca-se

para o núcleo ativando a expressão de genes específicos nos órgãos linfóides (Xiao, 2004).

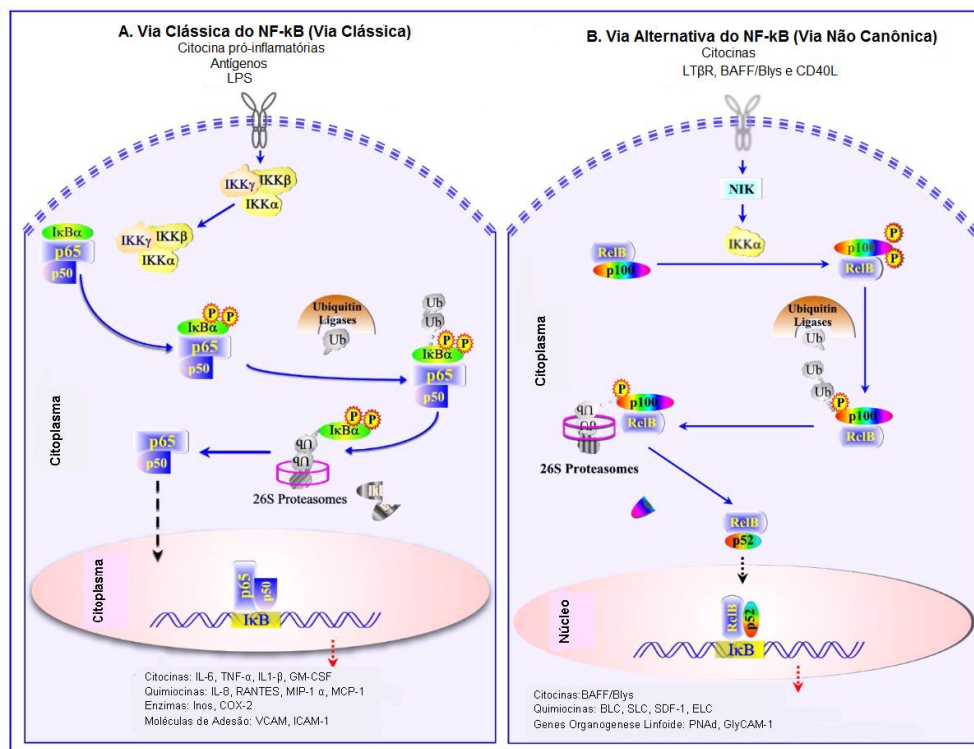


Figura 4: Vias de ativação do NFκB

Fonte: Baseado em Xiao, 2004.

A resposta inflamatória à infecção e aos danos teciduais é orquestrada pela função do NFκB (Mohamed e Fadden, 2009). A transcrição do NFκB desempenha importante papel em vários processos inflamatórios devido a alta expressão de genes de citocinas e quimiocinas, sendo que o controle inadequado da atividade do NFκB está associado à uma resposta hiperinflamatória (Nakajima *et al.*, 2006).

Associação entre o aumento da atividade osteoclástica e a ativação anormal da via do NFκB tem sido descrita em condições osteolíticas, como na periodontite (Xu *et al.*, 2009). Carayol *et al.* (2006) verificaram que a maioria dos genes induzidos pelo LPS da *P.gingivalis* em linhagens de células de monócitos poderia ser atenuada ou anulada pela inativação da sinalização do NFκB. Milward *et al.* (2007) mostraram os efeitos das bactérias periodontais (*P.gingivalis* e *F.nucleatum*) na expressão de genes nas células epiteliais oral devido a indução da ativação e transcrição do NFκB.

Os fatores de transcrição NFkB e Sp1 são grandes reguladores da expressão gênica na resposta imune. Eles são ativados por bactérias que se ligam aos receptores do tipo TLRs e subsequentemente ativam a via MAPK (Liu *et al.*, 2007).

1.4 Epigenética

O termo epigenética foi descrito pela primeira vez por Conrad Waddington, na década de 1940, e englobava a maior parte do que é conhecido como a biologia do desenvolvimento, e ressaltava que o fenótipo era resultado da interação do fator genético e ambiental. Holliday (1990) descreveu a epigenética como “estudo dos mecanismos temporal e espacial do controle da atividade genética durante o desenvolvimento do organismo complexo”. Em 2008, foi estabelecida a definição consensual da epigenética como “fenótipo hereditário estável resultante de mudanças nos cromossomos sem alteração na sequência do DNA” (Klose e Bird, 2006). Atualmente, a ênfase é focada no padrão de expressão genética que modifica durante o desenvolvimento, mas se torna estável na diferenciação final e pode ser ainda modificado por alterações ambientais cumulativas e ser transmitida durante a divisão celular (Richards, 2006).

A informação epigenética pode ser herdada de duas formas: modificação nas proteínas da cromatina, usualmente causada por alterações nas histonas, a qual é uniformemente distribuída no novo DNA sintetizado durante a replicação do DNA; ou metilação de resíduos específicos de citosinas no DNA pode ser copiado enzimaticamente (Klose e Bird, 2006) O padrão de metilação que inicia a condensação do DNA pela acetilação das histonas e outros mecanismos é conservada na sequência de replicação do DNA, assim a estrutura da cromatina local pode ser herdada pela próxima geração celular. Tanto as modificações das histonas, como o padrão de metilação do DNA, podem ser copiadas no DNA recém-sintetizado e transferidas para as gerações subsequentes (Barros e Offenbacher, 2014).

Os primeiros estudos em epigenética relataram a heterocromatina como regiões do genoma de baixa densidade gênica. Posteriormente, verificou-se

que a heterocromatina e a eucromatina estão relacionadas com o padrão de metilação do DNA e modificação genética, sugerindo que o “código genético” determina o estado da cromatina e, conseqüentemente, a expressão dos genes (Murrell *et al.*, 2005).

Eventos epigenéticos atuam na modificação química do DNA, assim a remodelação da cromatina e ativação- inativação seletiva de genes determina sua expressão durante o desenvolvimento. Diversas funções celulares como expressão gênica, reparo do DNA e proliferação celular são reguladas por mecanismos epigenéticos (Adcock *et al.*, 2007).

As modificações epigenéticas também podem ser adquiridas. O tabagismo, obesidade, diabetes, envelhecimento, toxinas e inflamação podem contribuir para alterações dinâmicas na modulação epigenética (Wu *et al.*, 2006; Offenbacher *et al.*, 2008; Gomez *et al.*, 2009; Alegria-Torres *et al.*, 2011).

A epigenética se refere a mudanças na expressão gênica, que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA (Baylin, 2005). As modificações epigenéticas incluem alterações químicas no DNA e proteínas associadas, ocasionando a remodelação da cromatina e ativação ou inativação do gene (Bird, 2002). Os três maiores métodos de regulação epigenética incluem: a metilação do DNA, a modificação da histona e moléculas de micro Ácido Ribonucléicos (RNA) (Barros & Offenbacher, 2014).

1.4.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é um importante mecanismo de modificação epigenética encontrado ao longo do genoma dos organismos vivos. A quantidade e função da metilação variam entre esses genomas, desde o DNA demetilado de *Caenorhabditis elegans* até o DNA fortemente metilado de muitos vertebrados (Klose e Bird, 2006).

A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH₃) é transferido da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 5 de uma citosina que geralmente precede uma guanina conectados por uma ligação fosfodiéster (dinucleotídeo CpG). Na metilação, o átomo de hidrogênio é substituído pelo grupo metil sem interferir nas bases do DNA

(Barros e Offenbacher 2009; Richards, 2006; Barres et al., 2009; Arand et al., 2012).

Os doadores de radical metil são obtidos pela dieta e são principalmente metionina, folato, colina e vitamina B12 (Zeisel, 2009). A metilação do genoma do DNA em mamíferos é catalisada por uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) (Subramaniam et al., 2014) (Figura 5).

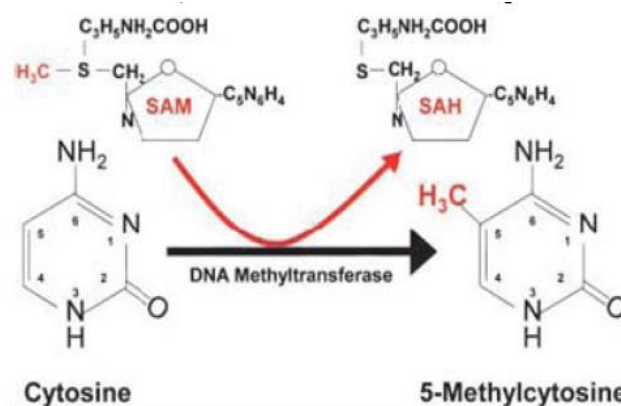


Figura 5: Esquema do processo de formação da 5-Metilcitosina (5-MeC) pela DNA metiltransferase.

Fonte: Attwood et al., 2002.

Nos mamíferos têm sido identificados três tipos de DNMTs: a DNMT1, DNMT2 e DNMT3 (incluem as formas DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L)(Goll e Bestor, 2005; Jurkowska *et al.*, 2011; Yanget *al.*, 2011). Todos os tipos têm uma parte de 10 sequências conservadas que configuram um domínio catalítico definido, que é altamente homóloga aos domínios equivalentes em diferentes espécies que vão deste eucariota superior até bactérias. Esse domínio catalítico serve para definir essa família de proteínas (Goll e Bestor, 2005).

A DNMT1 foi a primeira a ser identificada e o tipo mais abundante de DNMT em células somáticas de mamíferos (Goll e Bestor, 2005). Essa enzima tem uma grande preferência pelo DNA hemimetilado, e é considerada a proteína responsável pela manutenção do padrão de metilação global do genoma, uma vez que é responsável pela cópia do padrão de metilação após a

replicação do DNA pela associação com a fase S da replicação (Miremedi *et al.*, 2007; Espada, 2012). Nos mamíferos, a DNMT1 apresenta um domínio catalítico C-terminal conservado e um longo multi - domínio N-terminal de vários tamanhos, que codificam funções regulatórias (Espada, 2012). Três sequências na região N-terminal aumentam a precisão da manutenção da metilação e permite à enzima o acesso direto ao sítio de replicação nuclear. Essa interação permite a fita recém-sintetizada a ser rapidamente remetilada antes de ser empacotada na estrutura da cromatina (Malik e Brown 2000).

A DNMT2 ou TRDMT1 é a menor DNMT nos mamíferos, é composta somente do domínio C-terminal e não possui a região regulatória N-terminal. Sua estrutura sugere que ela participa do reconhecimento do dano do DNA, recombinação do DNA e reparo de mutação (Hermann *et al.*, 2003). Alguns estudos apontam o papel da DNMT2 na mediação da herança epigenética do RNA (Kiani *et al.*, 2013). Outros membros da família das DNMT2 podem catalisar a metilação de substrato de RNA (Goll *et al.*, 2006). A metilação pela DNMT2 também já foi reportada como protetora da clivagem do RNA transportador (RNAt) sob condições de estresse (Schaefer *et al.*, 2010).

A família da DNMT3 consiste em três diferentes proteínas em mamíferos: DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. A DNMT3A e DNMT3B não são capazes de diferenciar entre os sítios CpG não metilados e hemimetilados, e também não copiam um padrão de metilação específico ou contribuem para a manutenção do mesmo (Okano *et al.*, 1999). Ambas as enzimas tem a função de atuar com *de novo* metilação e apresentam uma distribuição ao longo do núcleo não associado com sítios de replicação durante a fase S (Xu *et al.*, 1999).

As DNMT3A e DNMT3B são amplamente expressas em células embrionárias, no estágio em que a maioria de eventos programados metilação *de novo* ocorre. A expressão das DNMTs (DNMT3A e DNMT3B) diminui após a diferenciação em tecidos somáticos adultos são muito expressas em células tumorais (Li *et al.*, 2006). As DNMT3 também apresentam alguma atividade específica na fase adulta, como a manutenção da auto renovação das células

tronco hematopoiéticas (Tadokoro *et al.*, 2007) e regulação da plasticidade sináptica do cérebro (Feng *et al.*, 2010).

As DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L auxiliam metiltransferase *de novo* aumentando sua capacidade de ligar com o doador do grupo metil e estimular sua atividade *in vivo* (Kareta *et al.*, 2006). A DNMT3L não possui atividade catalítica e é fator regulador para a *de novo* metilação. Sua sequência de aminoácidos é bem similar às outras DNMT3, entretanto não possui os resíduos necessários para a atividade de DNMT na região C-terminal (Deplus *et al.*, 2002). Mais pesquisas são necessárias para entender melhor o papel da DNMT3L.

Cooperação entre diferentes DNMTs é necessária em algumas regiões do genoma. É muito especulado que a DNMT1 atua como mantenedora da metilação durante a síntese de DNA, ao passo que as DNMT3A e DNMT3B atuam como enzimas “de novo” no desenvolvimento (Subramiam *et al.*, 2014). Porém, evidências têm sugerido que a DNMT1 pode ser requerida para *de novo* metilação do genoma e as DNMT3A e DNMT3B podem contribuir para a manutenção da metilação durante a replicação (Egger *et al.*, 2006).

Em um organismo eucariota, a metilação do DNA ocorre predominantemente em áreas ricas de CpG no DNA conhecidas como ilhas CpG. As ilhas são encontradas principalmente em áreas promotoras de genes ativos podendo também se estender para dentro do primeiro exon onde a transcrição é iniciada (Jones, 2003). Uma ilha CpG é definida como uma região de DNA, maior que 200 pb, com um conteúdo de GC acima de 50% e a razão da frequência entre o observado e o esperado de CpG (ob/esp) maior que 0,6 (Li e Dahiya, 2002).

O genoma tem aproximadamente 30.000 ilhas CpG (Costello e Plass, 2001). Aproximadamente 50% dos genes humanos contêm ilhas de CpG e a maioria dessas ilhas são não metiladas em tecidos normais (Johnson e Belshaw 2008). Os dinucleotídeos CpG não estão uniformemente distribuídos pelo genoma, ocorrem em agrupamentos (clusters) de sequências repetitivas, sequências satélites, repetições centroméricas ou pequenas extensões de DNA ricas em citosinas e guaninas (Lopez *et al.*, 2009).

A metilação de ilhas CpG está associada a condensação de cromatina e silenciamento da transcrição do gene correspondente (Esteller e Herman, 2002). A hipermetilação significa o aumento da metilação nas ilhas CpG e consequente inibição da transcrição gênica. A hipometilação é o decréscimo do conteúdo de 5-metilcitosinas, que pode ser causado pela diminuição da atividade enzimática das DNMTs, menor disponibilidade de doadores do grupo metil (SAM), maior concentração de S-adenosilcisteína (SAH), um inibidor da atividade enzimática das DNMTs, e bloqueio do acesso das DNMTs aos sítios sensíveis a metilação do DNA (Pereira *et al.*, 2001).

Os mecanismos moleculares que permeiam o silenciamento gênico por hipermetilação da região promotora envolvem a integração da metilação do DNA com a organização da cromatina e a regulação da acetilação das histonas. Já o estado não metilado está associado com uma estrutura de cromatina aberta e com transcrição ativa. O DNA metilado recruta um complexo de proteínas que promovem a desacetilação das histonas, que ocasiona a compactação das histonas e o silenciamento genético (Johnson e Belshaw, 2008).

Suter *et al.* (2004) afirmam que a metilação na molécula de DNA controla várias funções do genoma, entre elas: recombinação durante meiose e mitose, controle da replicação, controle de DNAs parasitas que se inserem no genoma humano, estabilização e manutenção da expressão gênica, regulação da diferenciação celular, inativação do cromossomo X, sendo essencial durante a morfogênese para que ocorra o desenvolvimento normal. Na inativação do cromossomo X e *imprinting* de genes, o alelo não expresso (paterno ou materno) apresenta a sua região promotora metilada (Jones, 2003; Strathdee e Brown, 2002). Na repressão de retrovírus, transposons e alguns elementos repetitivos, a metilação limita a propagação destes elementos pelo genoma (Mukai e Sekiguchi, 2002).

Nos mamíferos, os padrões de metilação do DNA são estabelecidos gradualmente durante diferentes estágios no início da embriogênese. Primeiramente, uma demetilação de todo genoma ocorre no embrião pré-implantado logo após a fertilização, destinado a restabelecer uma totipotência.

Uma segunda desmetilação seguida de re-metilação ocorre no período do desenvolvimento da linha germinativa em células germinativas primordiais para a geração de gametas totipotentes com marcas genômicas adequadas (Feng *et al.*, 2010).

O processo de reprogramação epigenética durante a embriogênese assegura o “apagamento” da informação epigenética durante a gametogênese e também “anula” o epigenoma das células-tronco pluripotentes da massa interna celular do blastocisto, fornecendo um amplo potencial de desenvolvimento (Wu e Sun, 2006). O padrão de metilação normal das células é mantido por meio de sucessivas divisões celulares em tecidos adultos e a herança desta informação é denominada de Herança Epigenética (Laird, 2003).

1.4.1.1 Fatores moduladores da metilação

O envelhecimento em geral está associado ao estresse oxidativo e a uma diminuição da efetividade da via metabólica (Daniel e Tollesbol 2015). A idade causa alterações dramáticas na distribuição da 5-metilcitosina no genoma, levando a uma diminuição da metilação (Knapowski *et al.*, 2002). Entretanto, esse decréscimo global da metilação associado com a idade não ocorre na região promotora de todos os genes (Li *et al.*, 2011). Maegawa *et al.* (2010) mostraram que ocorre a hipometilação global associada à idade, concomitantemente com hipermetilação de vários genes supressores tumorais.

Em relação ao gênero, Talens *et al.* (2010) mostraram que há uma grande similaridade no padrão de metilação entre homens e mulheres. Entretanto alguma diferença existe, a mais notável é a hipermetilação na região promotora do cromossomo X que ocorre nas mulheres (Hellman e Chess, 2007) e é mediada pela DNMT1 e DNMT3B (Hansen *et al.*, 2000). Outra diferença se refere às aberrações de metilação, que é mais frequente em homens que mulheres, abortados ou natimortos (Pliushch *et al.*, 2010). A metilação aberrante do DNA também é mais facilmente induzida em homens que mulheres por estímulos ambientais precoces, como exposição pré-natal ao tabagismo ou a falta de folato (Murphy *et al.*, 2012.).

Fatores ambientais também têm sido implicados na modulação da metilação e incluem poluentes como íons metálicos cromo (Shiao *et al.*, 2005), níquel (Salnikow e Costa, 2000), cádmio (Takiguchi *et al.*, 2003) e medicamentos (Veurink *et al.* 2005). Esses agentes podem interferir na atividade das DNMTs ou afetar a cascata metabólica que promove a síntese de S-adenosilmetionina (Tao *et al.*, 2000). Além dos fatores poluentes destaca-se como um fator ambiental que interfere no padrão de metilação, o tabagismo. A fumaça do cigarro é considerada um dos mais poderosos modificadores ambientais da metilação do DNA (Breitling *et al.*, 2011).

A fumaça do cigarro pode modular a metilação de algumas formas: (a) danos ao DNA e posterior recrutamento de DNMTs. Substâncias cancerígenas presentes na fumaça como arsênio, formaldeído, hidrocarbonetos podem danificar o DNA, causando quebras na cadeia dupla (Huang *et al.*, 2013). (b) a modulação pode ocorrer devido aos efeitos da nicotina sobre a expressão gênica (Lee e D'Alonzo, 1993). A nicotina é capaz de ligar e ativar os receptores de acetilcolina nicotínicos, aumentando a concentração de cálcio intracelular ocasionando a ativação da proteína de ligação a adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que é um fator de transcrição chave para muitos genes, alterando a expressão de vários genes (Shen e Yakeel, 2009). (c) podem alterar indiretamente a metilação do DNA através da modulação da expressão e atividade dos fatores de ligação ao DNA, uma vez que a fumaça aumenta a expressão de SP1 e ligação ao DNA em células epiteliais do pulmão (Mercer *et al.*, 2009; Di *et al.*, 2012). (d) hipóxia, uma vez que a fumaça do cigarro contém monóxido de carbono que se liga a hemoglobina (compete com oxigênio), diminuindo a oxigenação tecidual (Olson, 1984). A hipóxia causa maior regulação da HIF-1 α que por sua vez aumenta a expressão de metionina adenosiltransferase 2A (MAT2A), uma enzima que sintetiza a S-adenosilmetionina, que é uma grande doadora de metil (Di *et al.*, 2012).

Os fatores genéticos também podem modular a metilação. Alguns CpGs localizam-se diretamente em regiões de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) que envolvem alterações em citosinas e guaninas. Se citosinas ou guaninas sofrerem mutações para outros nucleotídeos, esses nucleotídeos serão não metilados (Bell *et al.*, 2011).

O estado nutricional possui importante papel na metilação do DNA, uma vez que esse processo é sensível ao excesso e deficiência de vários componentes da dieta. O excesso ou falta endógena ou exógena de colina, metionina, ácido fólico, vitamina B6, B12 e zinco podem alterar o fornecimento do grupo metil (Zijno *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007).

As infecções também podem ter um impacto nas modificações epigenéticas. Alguns estudos apontam que a infecção por *Helicobacter pylori* induz o aumento da metilação nas ilhas CpGs. Essa metilação inadequada pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer gástrico (Ekstrom *et al.*, 2001; Maekita *et al.*, 2006). Para avaliar a relação entre metilação do DNA e a infecção bacteriana, Niwa *et al.* (2010) infectaram gerbilos da Mongolia com *H.pylori* e encontraram metilação na ilha CpG 5 a 10 semanas depois. O nível de metilação aumentou em aproximadamente 50 semanas atingindo níveis de 10 a 200 vezes superiores a animais não infectados. A metilação diminuiu após a erradicação da infecção, entretanto continuou alta em relação aos não infectados. O tratamento com imunossupresor, o qual bloqueia a inflamação sem afetar a colonização bacteriana, previne a metilação inadequada. Isso sugere que as mudanças epigenéticas ocorrem como resultado de uma inflamação acompanhada de infecção bacteriana (Niwa *et al.*, 2010). A presença bacteriana pode servir como indutor para alteração do padrão de metilação e expressão gênica, sendo a inflamação um importante modulador desse padrão (Barros e Offenbacher, 2014).

Tem sido sugerida a ligação entre inflamação e níveis de metilação no câncer, uma vez que nos tecidos inflamados os neutrófilos e eosinófilos produzem substâncias como citosinas halogenadas (Valinluck e Sowers, 2007). A DNMT1 não é capaz de distinguir entre o DNA metilado e o halogenado, resultando no aumento da *de novo* metilação em células do tecido inflamado (Valinluck e Sowers, 2007). O trabalho de Hahn *et al.* (2008) também propõe que o processo inflamatório pode levar a alterações epigenéticas e predispor ao desenvolvimento de certos tipos de câncer. Eles afirmam que a inflamação induz a formação de oxigênio reativo que afeta os tecidos inflamados, através de danos as proteínas, lipídeos e DNA. Os danos ao DNA causado pelo estresse oxidativo pode resultar em modificações como mutações nas bases,

alteração no açúcar e quebras do DNA. A DNMT1 não consegue distinguir a citosina halogenada da metilcitosina, promovendo uma hipermetilação.

1.4.1.2 Metilação e doença periodontal

Tendo em vista que os eventos epigenéticos podem influenciar a expressão de genes relacionados à resposta imune e devido à presença de indícios da associação entre infecção/inflamação e perfil de metilação, alguns pesquisadores têm despertado o interesse no estudo da metilação na doença periodontal. Os fatores epigenéticos podem interferir na resposta do hospedeiro aos periodontopatógenos, contribuindo para o desenvolvimento da doença periodontal em cada indivíduo (Gomez *et al.*, 2009).

A maioria dos trabalhos tem investigado os genes de citocinas e quimiocinas, uma vez que vários destes genes podem ser regulados por mecanismos epigenéticos, como os genes de Interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e IL12 (Fitzpatrick e Wilson, 2003). A regulação epigenética da expressão gênica desempenha um importante papel, uma vez que pode aumentar ou diminuir a expressão de genes e citocinas pró e anti-inflamatórias importantes na inflamação (Wen *et al.*, 2008).

Na análise do gene da IL-8, observaram níveis de metilação maior no grupo controle comparado ao grupo com periodontite. Esse padrão de metilação foi tecido específico, considerando as células epiteliais orais (Oliveira *et al.*, 2009). Andia *et al.* (2010) também observaram um padrão de hipometilação da IL-8 em indivíduos com periodontite agressiva generalizada.

Em relação à região promotora da IL-6, uma metilação parcial foi verificada nos tecidos gengivais tanto de indivíduos com periodontite crônica quanto indivíduos sem a doença (Stefani *et al.*, 2013), embora um aumento da expressão de IL-6 tenha sido verificado no grupo periodontite. Ishida *et al.* (2012) observaram um aumento da IL-6 no soro de indivíduos com periodontite associado com à hipometilação no CpG localizado na região -74 do gene.

Viana *et al.* (2011) pesquisando os genes da IL-10 e IFN- γ mostraram que o padrão de metilação foi similar nos grupos doentes e saudáveis.

Entretanto, Zhang *et al.* (2010) verificaram uma menor metilação do DNA no grupo de periodontite e relacionada com aumento da transcrição do gene IFN- γ . Considerando a IL-10, outro trabalho demonstrou que três sítios próximos da região promotora do gene em torno polimorfismo -1087 era metilado em células sanguíneas e do tecido gengival em indivíduos controles e caso(Larsson *et al.*, 2012).

Zhang *et al.*(2013) estudaram o padrão de metilação em biópsia gengival de indivíduos com periodontite crônica e periodontalmente saudáveis. Observaram que a região promotora do TNF- α era hipermetilada em dois sítios CpG, resultando em uma diminuição da expressão, e o tratamento com agente demetilante *in vitro* levou ao aumento da expressão deste.

Outros genes relacionados ao processo inflamatório na doença periodontal também foram alvos de estudos. Zhang *et al.* (2010a) verificaram uma hipermetilação no promotor do gene prostaglandina E2 (PGE2) em pacientes com periodontite crônica. Os autores sugerem que a persistência da inflamação crônica e o biofilme podem ocasionar alterações epigenéticas nos tecidos bucais. A hipermetilação também foi observada nos genes da COX2 e da E-caderina em pacientes com periodontite crônica (Loo *et al.* 2010). A demetilação dos genes SOCS1 e Line 1 foi encontrada em indivíduos periodontalmente saudáveis quando comparado com o grupo de periodontite agressiva (Batista *et al.*, 2014).

Oliveira *et al.* (2011) avaliaram o padrão de metilação na região promotora dos genes *TLR-2* e *TLR-4* em pacientes com e sem periodontite crônica, fumantes e não fumantes. Os resultados mostraram hipometilação no gene TLR4 nos grupos caso e controle e um mosaico de DNA metilado/não metilado no gene TLR2 para ambos os grupos. Um padrão de hipermetilação do gene TLR2 associado aos baixos níveis de transcrição gênica e à gravidade da periodontite crônica, já foram demonstrados previamente pelo nosso grupo (Amormino *et al.*, 2013).

Além dos estudos sobre a metilação em genes específicos envolvidos com a resposta imune na doença periodontal, investigações sobre a influência dos estímulos periodontopatogênicos nos eventos epigenéticos também foram

realizadas. Yin e Chung (2011) mostraram que a presença de bactérias resulta em modificações epigenéticas no epitélio gengival. Os dados desse trabalho sugerem que diferentes perfis de metilação são resultantes das diversas exposições bacterianas. A *P.gingivalis* pode induzir uma hipometilação no gene ZNF287, que sintetiza a proteína p53, e a alta expressão desse gene está também associada com a doença cardiovascular. Ao passo que o *F.nucleatum* pode promover uma hipermetilação no gene MALT1, inibindo a ativação do NF- κ B e prejudicando a resposta imunológica do hospedeiro. Os autores concluem que o epitélio oral responde de forma distinta à presença de diferentes bactérias, variando os mecanismos epigenéticos em vários genes.

Pereira *et al.* (2013) avaliaram como o LPS da *P.gingivalis* pode modular os níveis de expressão gênica das enzimas DNMT1, DNMT3A e JMJD3 em culturas de ceratinócitos humanos e fibroblasto gengival, em amostras de indivíduos com periodontite crônica e sem a doença. Eles verificaram que não houve diferença da expressão das enzimas entre os grupos e que o LPS regula negativamente a expressão das enzimas DNMT1, DNMT3A e JMJD3 nos ceratinócitos.

Outra pesquisa apontou que o LPS da *P.gingivalis* induz a hipermetilação do fator de transcrição RUNX2, que é um fator chave associado com a diferenciação dos osteoblastos, nos fibroblastos do ligamento periodontal humano. Houve também uma diminuição da expressão desse gene e essa alteração pode impedir que ocorra a regeneração periodontal (Uehara *et al.*, 2014).

Miao *et al.*, (2014) verificaram que a *T. denticola* aumenta a ativação do MMP-2 nos fibroblastos do ligamento periodontal. A região promotora deste gene é hipometilada e é consistente com a expressão constitutiva da pró-MMP-2 nas células dos fibroblastos do ligamento periodontal. A *T.denticola* aumentou a regulação da MMP-2 e a ativação crônica da pró-MMP-2 mostrando o mecanismo *in vivo* da cronicidade da periodontite.

Andia *et al.* (2015) estudaram o padrão de metilação de SOCS1, SOCS3 e LINE-1 em tecidos gengivais submetidos a microdissecção. Eles observaram que os níveis de metilação do DNA para SOCS1, SOCS3 e LINE-1 não diferiu

entre os grupos com periodontite crônica e controle e entre os tecidos (epitelial e conjuntivo).

Kojima et al. (2016) avaliaram 60 indivíduos adultos japoneses, 30 com periodontite crônica e 30 com artrite reumatóide. O DNA foi isolado a partir de sangue periférico modificado por bissulfito de sódio e analisado por seqüenciamento para avaliar o padrão de metilação do gene *TNF- α* . Os resultados mostram o padrão de hipermetilação do gene *TNF- α* em adultos japoneses com artrite reumatóide e periodontite crônica.

A comunidade científica apenas iniciou os estudos sobre os eventos epigenéticos na doença periodontal. Até o momento, os dados obtidos são inconclusivos e estudos adicionais são necessários para elucidar o papel da metilação em genes importantes da resposta imune na doença periodontal, assim como a participação dos periodontopatógenos neste processo. O esclarecimento destas questões possibilitará melhor compreensão da patogênese da doença e, no futuro, o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e prevenção à gravidade da doença periodontal, aumentando a chance dos resultados favoráveis na clínica odontológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o padrão de metilação dos genes *CD14* e *NFκB* e a transcrição das DNA metiltransferases na periodontite crônica.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar o padrão de metilação e a transcrição do gene *CD14* em fragmentos gengivais de pacientes com periodontite crônica e controle, fumantes e não fumantes;
- b. Avaliar o padrão de metilação e a transcrição do gene *NFκB* em fragmentos gengivais de pacientes com periodontite crônica e controle, fumantes e não fumantes;
- c. Avaliar a transcrição das DNA metiltransferases (*DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*) em fragmentos gengivais de pacientes com periodontite crônica e controle, fumantes e não fumantes;

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretária Municipal de Saúde de Belo Horizonte, obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 196/96 e 304/00, do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, recebendo o parecer número ETIC-075/11 COEP/UFMG (Anexo 1) e o número 428.667 COEP/SMSPBH (Anexo 2) .

Os participantes foram devidamente informados sobre a pesquisa, seus métodos e objetivos, e incluídos no estudo somente após a autorização pela assinatura do consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1). Os pacientes submetidos à triagem receberam tratamento odontológico indicado, independente de sua participação na pesquisa.

3.2 Metodologia

3.2.1 Grupos amostrais

Os pacientes foram submetidos à anamnese e ao exame clínico. O exame clínico periodontal foi realizado por um único examinador previamente calibrado (κ 0,85 para profundidade de sondagem e 0,88 para o nível de inserção clínica). Os parâmetros verificados foram: profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento à sondagem (SS). Para os parâmetros PS e NIC, a sondagem foi realizada em seis sítios por dente e anotada os maiores valores nas superfícies vestibular, lingual/palatina, mesial e distal. Os dados referentes ao SS foram registrados na superfície de todos os dentes no momento da realização da PS ou até 30 segundos de forma dicotômica (+) e (-). O exame clínico foi realizado obedecendo às normas de biossegurança, com o auxílio de um espelho clínico e uma sonda periodontal milimetrada (modelo da Universidade da Carolina do Norte Hu-friedy®).

O grupo caso foi constituído por indivíduos com periodontite crônica, provenientes das Clínicas de Periodontia, Cirurgia da Faculdade de Odontologia da UFMG (FO-UFMG) e no Centro de Especialidade Odontológica de Venda Nova (CEO-Venda Nova). O grupo controle foi composto por indivíduos sem periodontite, em tratamento nas clínicas da FO-UFMG e CEO-Venda Nova.

Os critérios de inclusão no grupo caso foram realizados de acordo com os critérios estabelecidos por Armitage (1999) e Lopez et al. (2002). Os critérios de exclusão foram: uso de antibiótico ou antiinflamatório nos últimos seis meses, uso de medicações que apresentam associação com crescimento gengival, gestantes ou lactantes, condições sistêmicas alteradas, como diabetes, hepatite, pacientes imunocomprometidos, elementos dentários com pericoronarite e indivíduos com menos de 15 dentes.

Os pacientes foram alocados nos grupos descritos abaixo:

- **Grupo Controle: Sem periodontite**

As amostras de fragmento gengival foram coletadas em sítios com ausência de sinais clínicos de inflamação gengival: alteração de cor, forma, volume, textura, sangramento a sondagem e PS menor ou igual a 3mm.

- **Grupo Periodontite Crônica**

As amostras de fragmento gengival foram coletadas em sítios com presença de sangramento a sondagem e $PS \geq 4\text{mm}$. Os indivíduos apresentavam quatro ou mais dentes com um ou mais sítios com $PS \geq 4\text{mm}$ e $NIC \geq 3\text{mm}$ (LOPEZ et al., 2002), em mais de 30% dos sítios de indivíduos com periodontite crônica, segundo a classificação de Armitage (1999). Todos os indivíduos do grupo caso apresentavam periodontite crônica avançada generalizada.

3.2.1 Coleta das amostras

As amostras de fragmento gengival do grupo periodontite crônica foram obtidas de indivíduos em tratamento periodontal. A coleta foi realizada em sítios que apresentavam sangramento à sondagem, profundidade de sondagem alterada, perda inserção clínica e com indicação de cirurgia periodontal, e/ ou indicação de exodontia devido ao prognóstico desfavorável.

As amostras do grupo controle foram coletadas durante exodontia de dentes com indicação ortodôntica ou do lado ipsilateral de cirurgia de aumento de coroa clínica, em dentes sem alteração inflamatória clínica, sangramento a sondagem, profundidade de sondagem alterada ou perda de inserção clínica.

Os fragmentos gengivais coletados foram divididos em três cortes, um corte foi armazenado em 1mL de solução conservadora de ácidos nucleicos (RNAholder, BioAgency, Brasil), e os outros dois cortes em Tissue-tek (Sakura, Torrance, CA, USA), ambas estocadas a -80°C até o processamento das amostras.

3.2.2 Avaliação histológica

Uma parte do fragmento gengival armazenado em Tissue-tek (Sakura, Torrance, CA, USA) foi submetida a cortes de 5 micrometros no criostato, a -35° C, e posterior coloração por Hematoxilina e Eosina (HE) para a avaliação histológica.

A contagem das células inflamatórias foi realizada no tecido conjuntivo, no aumento de 400x, considerando o maior número de campos possíveis de cada corte e realizada a média por campo.

3.2.3 Extração e Quantificação do DNA

O outro fragmento gengival armazenado em Tissue-Tek (Sakura, Torrance, CA, USA) foi incubado com proteinase K a 55°C, por dois a três dias até a completa digestão do tecido. Posteriormente realizou-se a extração do DNA pelo kit QIAamp DNA Tissue Mini Kit (Qiagen, Alemanha), seguindo as

instruções do fabricante. O DNA extraído foi quantificado no Nanodrop (ND1000) e estocado a -20°C.

Foram considerados DNA puros aqueles que apresentaram leitura de relação DNA/proteína (260/280) acima de 1,8 e relação (260/230) acima de 1,7.

3.2.4 Avaliação do padrão de metilação do DNA

O padrão de metilação dos genes *CD14* e *NFKB* foram avaliados utilizando o *EpiTect® Methyl quantitative PCR* (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real (qPCR) (SABiosciences, Qiagen, Chatsworth, CA), seguindo as instruções do fabricante. O método consiste na detecção do DNA após a clivagem com enzimas de restrição, uma enzima cliva o DNA metilado e outra enzima o DNA não metilado. O DNA sem enzimas é usado como controle positivo e o DNA tratado com as duas enzimas, como controle negativo. Após a digestão, as amostras foram submetidas à qPCR no equipamento CFX96 (Biorad), utilizando primers que flanqueiam a região promotora de interesse.

As frações relativas de DNA metilado, não metilado e parcialmente metilado foram determinadas por comparação da quantidade observada em cada digestão com o controle positivo (sem enzima). Os dados foram analisados usando um programa fornecido pelo fabricante (SABiosciences, Qiagen, Chatsworth, CA).

3.4.5 Extração e quantificação do RNA

O fragmento gengival estocado em *RNAholder* (BioAgency, São Paulo, Brasil) foi macerado e posteriormente homogeneizado com *Tissue Grinder* (Kontes, Vineland, NJ, USA) em Trizol (4°C). A extração do RNA foi feita seguindo as recomendações propostas pelo fabricante (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA).

A cada amostra foi adicionado 200µl de clorofórmio (Merck, Inc., Whitehouse station, NJ, USA), agitado em vórtex durante 15 segundos e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi realizada uma

centrifugação a 12.000rpm a 4°C por 15 minutos. Após a centrifugação foram observadas 3 fases na solução : fase vermelha (orgânica), interfase contendo o DNA e fase aquosa incolor contendo o RNA.

A fase aquosa foi transferida para outro tubo contendo álcool isopropílico (Merck, Inc., Whitehouse station, NJ, USA) e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 12.000rpm, a 4°C por 15 minutos, e o sobrenadante desprezado. O precipitado de RNA foi lavado com 1ml de álcool etílico 75% gelado (Merck, Inc., Whitehouse station, NJ, USA) e centrifugado a 12.000rpm, a 4°C por 5 minutos, descartando novamente o sobrenadante. O *pellet* de RNA foi seco a temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. Em seguida foi diluído em 15 µl de água livre de nuclease DEPC, quantificado no Nanodrop e armazenado a -80°C. Foram consideradas puras as amostras que apresentaram uma relação RNA/proteína (260/280) maior que 2,0.

3.4.6 Transcrição Reversa – Síntese de DNA complementar (cDNA)

Após a extração de RNA, as amostras foram submetidas ao tratamento com Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA), segundo o protocolo do fabricante. Para o experimento, 1µg de RNA foi diluído em volume final de 8µL, contendo 1µL de tampão e 1µL da enzima DNase. Após 15 minutos de incubação, a temperatura ambiente, foi adicionado 1µL de EDTA e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 70°C para a inativação da enzima DNase. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado após reação de transcrição reversa utilizando o kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA), seguindo protocolo proposto pelo fabricante.

3.4.7 Reação em Cadeira da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

A transcrição do CD14, do NFκB e das DNMTs foram realizadas pela qPCR, utilizando o equipamento CFX96 BioRad e o sistema *TaqMan Gene*

Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A reação foi padronizada com 500 ng de cDNA em volume final de 20 µl nas condições recomendadas pelo fabricante (50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto). Todas as reações foram realizadas em duplicata. Como controle endógeno foi utilizado o gene RPLPO (RPLPO large ribosomal protein; 4333761F, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A transcrição gênica foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Applied Biosystems User Bulletin No. 2) como previamente descrito (Livak e Schmittgen, 2001). O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ou Ct (Threshold cycle) é uma equação matemática, na qual as mudanças na expressão gênica são calculadas baseadas nas diferenças entre as calibradoras e as experimentais, normalizadas por uma amostra de referência. O valor inferido para ΔCt equivale às diferenças entre o valor da média dos Cts do gene de interesse (alvo) e a média dos Cts do gene normalizador (endógeno). O cálculo da fórmula $\Delta\Delta Ct$ envolve a subtração entre o valor de ΔCt para cada amostra experimental e o valor do ΔCt para as amostras calibradoras. Um conjunto (*pool*) de amostras de sangue de indivíduos saudáveis foi usado como amostras calibradoras.

3.6 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0 (Chicago, EUA). O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para verificar a normalidade dos grupos amostrais. A análise estatística foi realizada utilizando o teste Kruskal-wallis, seguido do teste Dunn's quando a diferença estatística entre os grupos foram detectadas. Coeficiente de correlação de Spearman foi usado para verificar a correlação entre variáveis. Foram consideradas estatisticamente significativas as análises com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros clínicos e demográficos da população

As características dos grupos de estudo estão descritas na **Tabela 1**. Os resultados dos indivíduos fumantes foram considerados separados dos não fumantes, devido ao fato do fumo ser um fator risco para a periodontite.

Tabela 1: Parâmetros clínicos e demográficos

	Controle	Periodontite
	(N=30)	(N=30)
Idade (anos) média±DP	36,75±7,79	36,75±7,79
Genêro (n)		
Mulher	15 (50%)	15 (50%)
Homem	15 (50%)	15 (50%)
Profundidade de sondagem (mm) média±DP	1,58±1,12	7,75±1,92*
Nível inserção clínica (mm) média±DP	2,17±0,58	9,15±2,32*
Perda de osso alveolar	Não	Sim
Percentual de sítios com sangramento a sondagem	10,87%	60,93%*
Tabagismo		
Fumantes	10 (33,33%)	10 (33,33%)
média de cigarros/dia	14,80±8,94	15,90±10,13
Não fumantes	20 (66,67%)	20 (66,67%)

*p<0,05

4.2 Avaliação histológica

Considerando os indivíduos não fumantes, a mediana do número de células inflamatórias por campo na periodontite crônica foi de 295, variando de 100 a 502. No grupo controle, a mediana foi de 34,5, variando de 17 a 98 células inflamatórias por campo. A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

Nos fumantes, a mediana do número de células inflamatórias foi de 215 na periodontite crônica, variando de 197 a 401. No grupo controle, a mediana foi de 29,5 variando de 16 a 76. A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

O infiltrado inflamatório era misto, difuso e com predomínio de células mononucleares em todos os grupos.

4.3 Gene *CD14*

4.3.1 Metilação de *CD14*

A mediana das taxas de DNA metilado, não metilado e metilação parcial são observadas nos grupos periodontite e controle estão representadas na **Figura 6** (não fumantes) e **Figura 7** (fumantes) e demonstram o perfil de metilação de cada grupo.

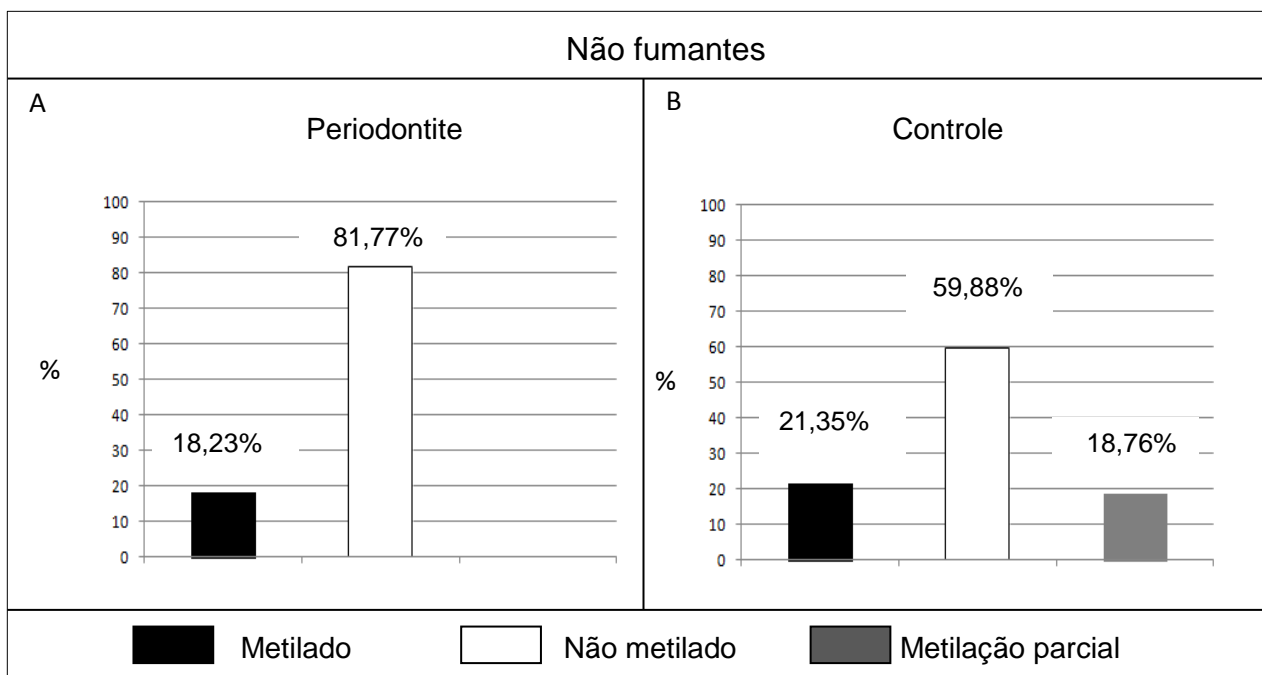


Figura 6: Padrão de metilação do gene *CD14* nos grupos periodontite crônica (A) e controle (B), considerando os indivíduos não fumantes. A barra preta representa a mediana referente às taxas de DNA metilado, a barra branca representa a mediana das taxas de DNA não metilado e a barra cinza representa a mediana das taxas de metilação parcial.

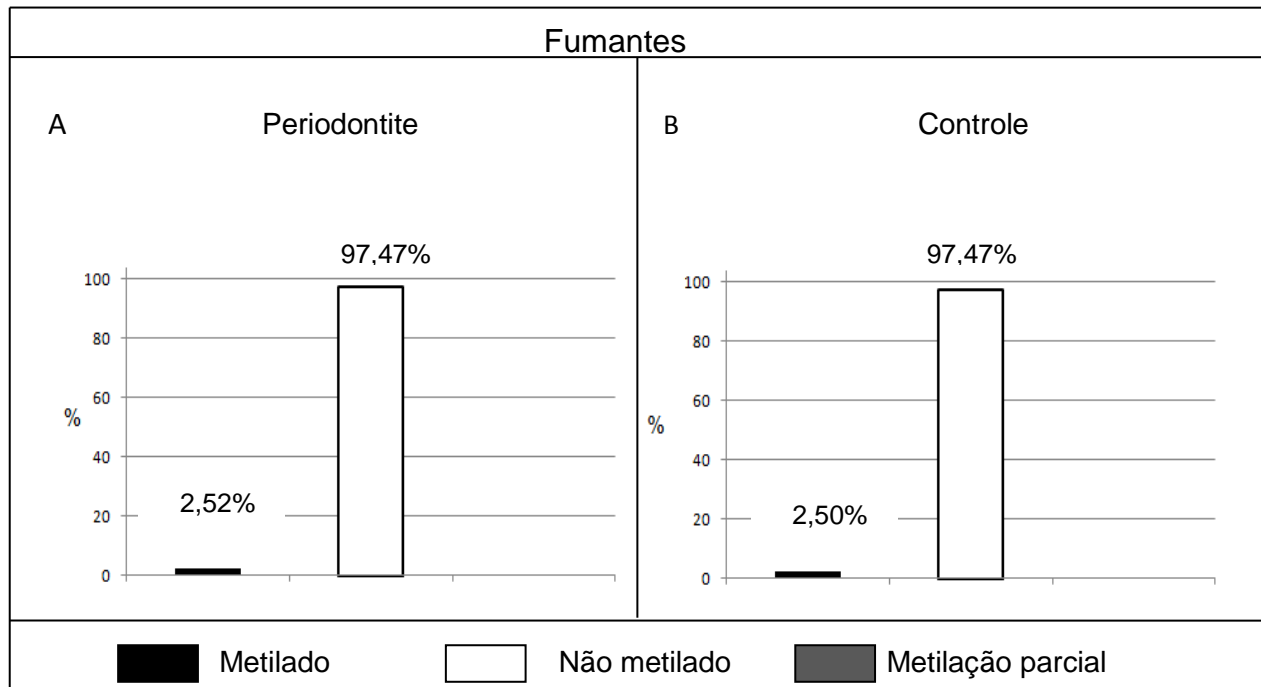


Figura 7: Padrão de metilação do gene *CD14* nos grupos periodontite crônica (A) e controle (B), considerando os indivíduos fumantes. A barra preta representa a mediana referente às taxas de DNA metilado, a barra branca representa a mediana das taxas de DNA não metilado e a barra cinza representa a mediana das taxas de metilação parcial.

Considerando os indivíduos não fumantes, não houve diferença significativa do percentual de DNA metilado ($p=0,904$) e de não metilado ($p=0,065$) entre os grupos de periodontite e controle ($p=0,904$). A metilação parcial do *CD14* ocorreu somente no grupo controle (**Figura 6 A e B**).

Considerando os fumantes, não houve diferença entre os grupos periodontite e controle, comparando os percentuais de DNA metilado ($p=0,739$) e não metilado ($p=0,739$) (**Figura 7 A e B**).

Um perfil de DNA não metilado foi observado nos grupos controle e periodontite crônica, independente do tabagismo. Contudo, no grupo controle houve um maior percentual de DNA não metilado nos indivíduos fumantes comparado aos não fumantes ($p=0,003$) **Figura 8**.

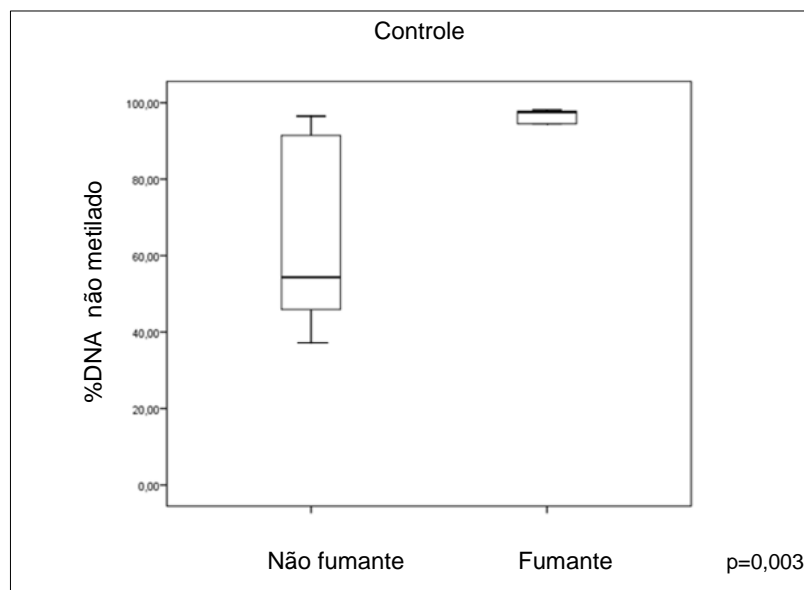


Figura 8: Percentual de DNA não metilado do gene *CD14* no grupo controle (não fumante x fumante).

Em relação aos não fumantes, uma correlação negativa foi observada entre o percentual de DNA não metilado do gene *CD14* e o número de células inflamatórias ($p=0,003$, $r=-0,635$) na periodontite crônica (**Figura 9**). Em relação aos parâmetros clínicos, não foi observada correlação significativa entre a porcentagem de DNA não metilado do *CD14* e a PS ($p=0,826$; $r=-0,052$), e o NIC ($p=0,711$; $r=-0,088$). Nenhuma correlação significativa foi encontrada no

grupo controle ($p=0,880$; $r=0,036$; %DNA não metilado x número de células inflamatórias).

Em relação aos fumantes, no grupo de periodontite crônica não houve correlação significativa entre a porcentagem de DNA não metilado do *CD14* e número de células inflamatórias ($p=0,074$, $r=-0,588$), PS ($p=0,905$, $r=-0,043$), NIC ($p=0,987$, $r=0,006$). No grupo controle fumante, também não houve correlação significativa com o número de células inflamatórias ($p=0,960$; $r=-0,018$).

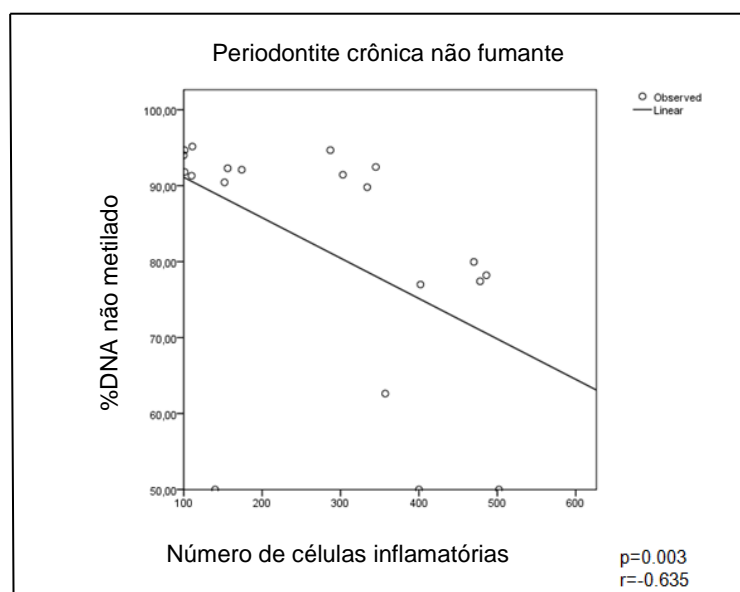


Figura 9: Correlação negativa entre o percentual de DNA não metilado e número de células inflamatórias no grupo periodontite crônica não fumante.

4.3.1.1 Transcrição de *CD14*

Considerando os indivíduos não fumantes, o grupo de periodontite crônica apresentou uma maior transcrição do gene *CD14* comparado ao grupo controle ($p=0,018$) **Figura 10**. Não foi verificada correlação significativa entre os níveis de transcrição do gene *CD14* e o percentual de DNA não metilado nos grupos periodontite crônica ($p=0,087$) e controle ($p=0,096$). Uma correlação positiva foi encontrada entre os níveis de transcrição do *CD14* e o número de células inflamatórias na periodontite crônica ($p=0,019$, $r=0,546$), **Figura 11**. Em relação aos parâmetros clínicos, não foi observada correlação significativa

(PS:p=0,291, r=0,263; NIC:p=0,051, r=0,466). No controle, não houve correlação significativa entre os níveis de transcrição e o número de células inflamatórias (p=0,730; r=-0,101).

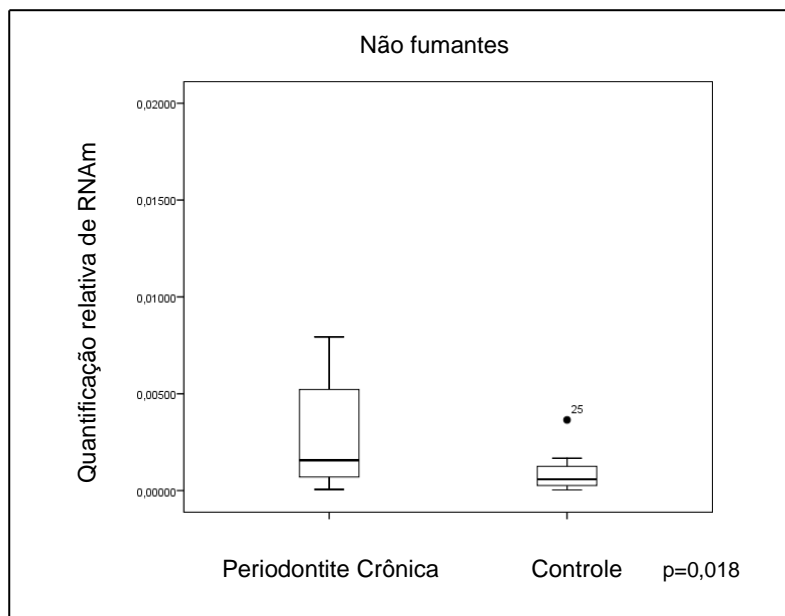


Figura 10: Comparação do nível de transcrição do *CD14* entre os grupos periodontite crônica e controle em não fumantes.

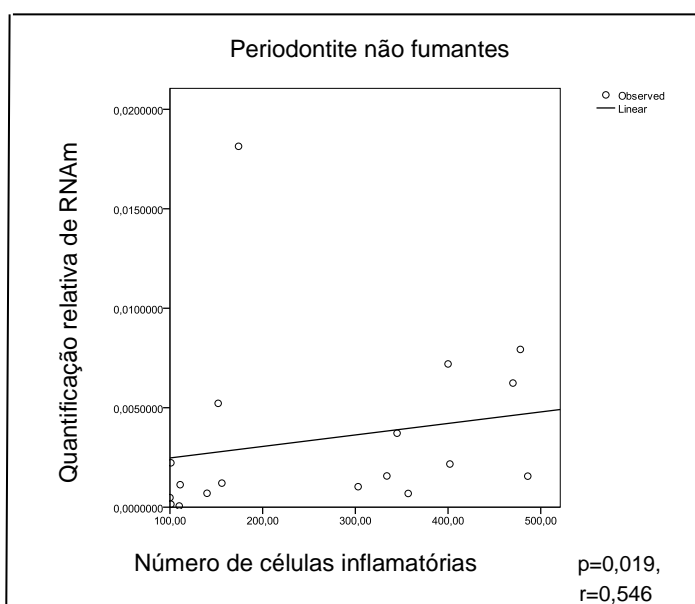


Figura 11: Correlação positiva entre transcrição de *CD14* e número de células inflamatórias no grupo de periodontite não fumante.

Em relação aos fumantes, não houve uma diferença nos níveis de transcrição de CD14 entre os grupos periodontite ($p=0,959$) e controle ($p=0,432$). Não foi verificada correlação significativa entre os níveis de transcrição do gene CD14 e o percentual de DNA não metilado nos grupos periodontite crônica ($p=0,153$) e controle ($p=0,067$). Nenhuma correlação foi observada em relação ao número de células inflamatórias (controle; $p=0,867$, $r=-0,071$; periodontite, $p=0,160$, $r=0,548$) e aos parâmetros clínicos (PS: $p=0,795$, $r=-0,110$; NIC: $p=0,620$, $r=-0,209$).

Os níveis de transcrição do CD14 foram significativamente maiores no grupo fumante comparado aos não fumantes, tanto no grupo controle ($p<0,001$) quanto no grupo periodontite ($p=0,017$) **Figura 12A e B**.

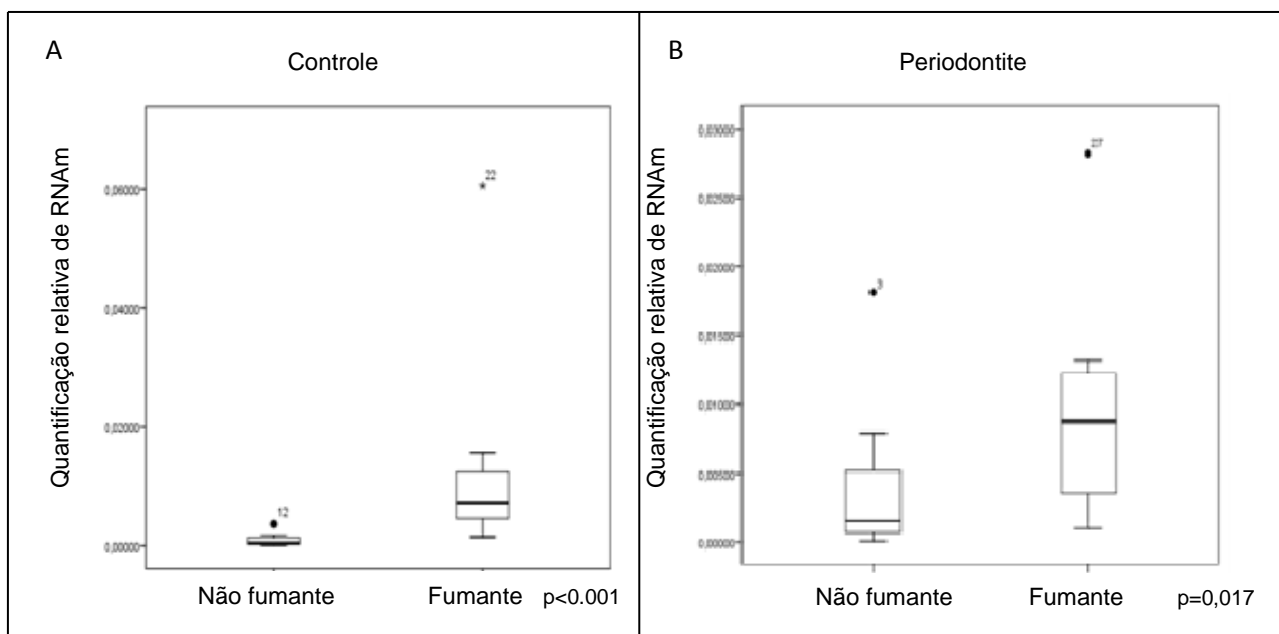


Figura 12: (A) Análise do nível de transcrição do CD14 no tecido gengival do grupo controle entre não fumantes e fumantes. (B) Análise do nível de transcrição do CD14 no tecido gengival do grupo periodontite crônica entre não fumantes e fumantes.

4.3.2 Gene *NFκB*

4.3.2.1 Metilação do *NFκB*

As taxas de DNA metilado, não metilado e metilação parcial são observadas nos grupos periodontite e controle está representado na **Figura 13** (não fumantes) e **Figura 14** (fumantes) e demonstram o perfil de metilação de cada grupo.

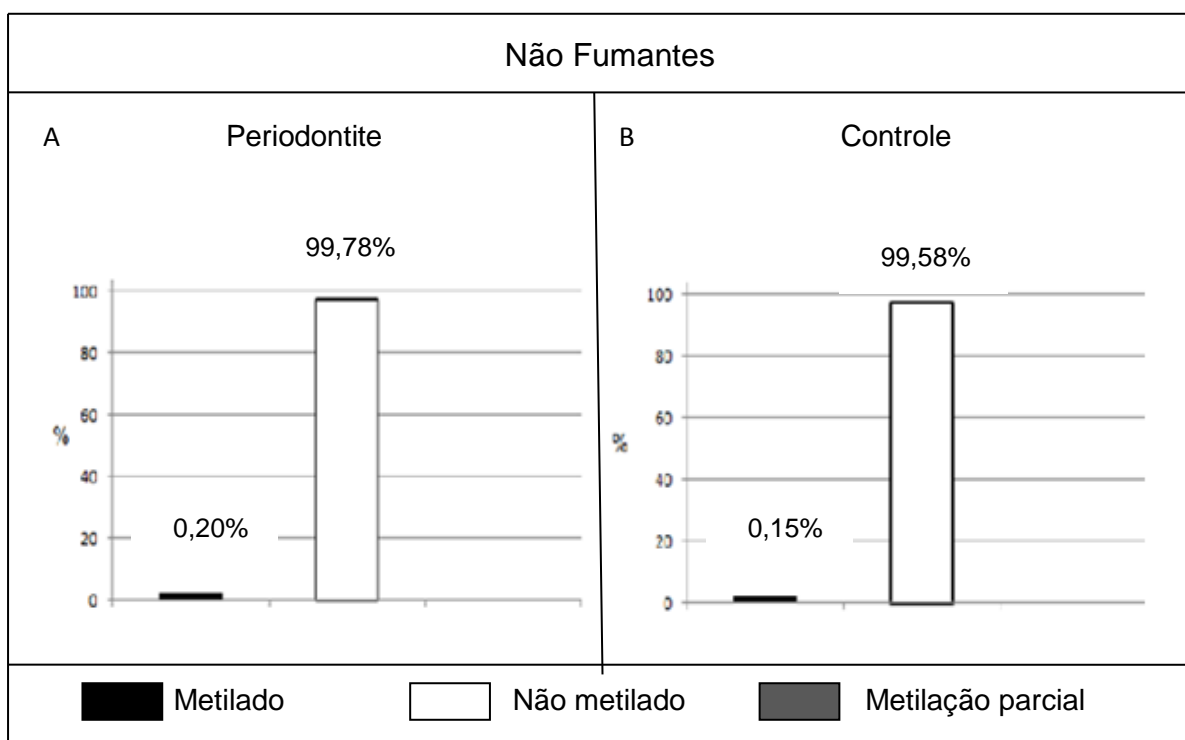


Figura 13: Padrão de metilação do gene *NFκB* nos grupos periodontite crônica (A) e controle (B), considerando os indivíduos não fumantes. A barra preta representa a mediana referente às taxas de DNA metilado, a barra branca representa a mediana das taxas de DNA não metilado e a barra cinza representa a mediana das taxas de metilação parcial.

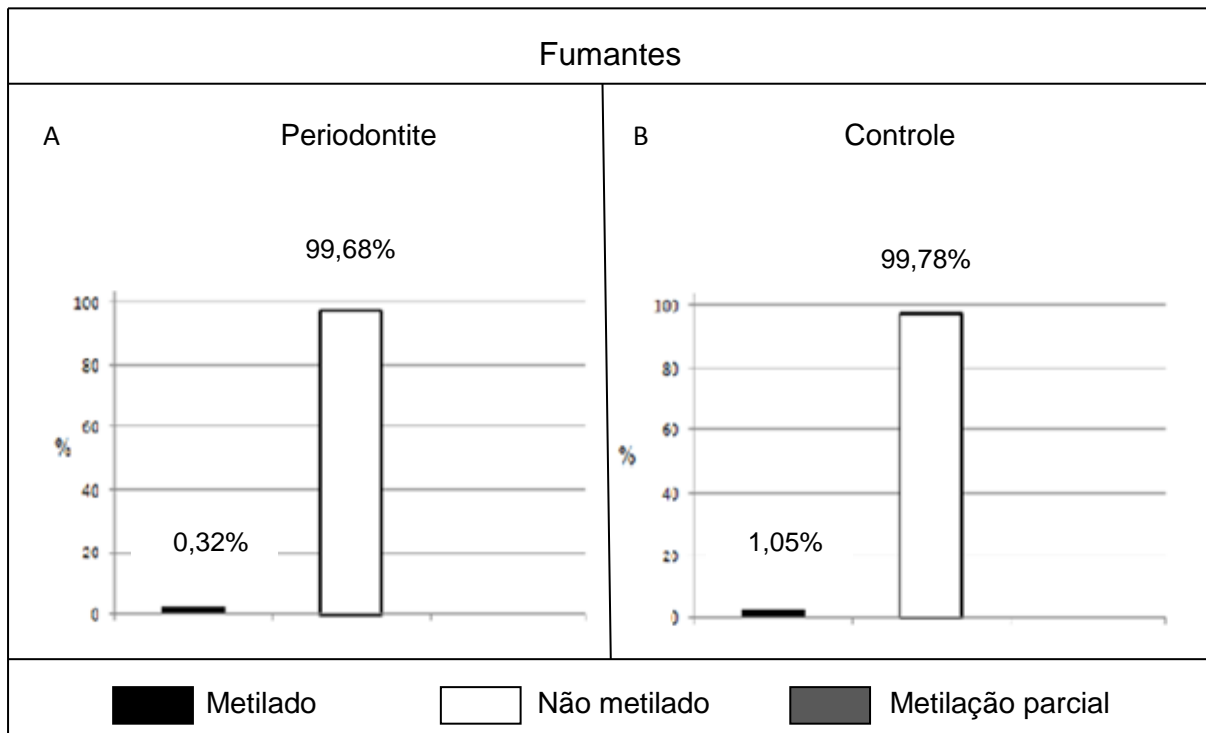


Figura 14: Padrão de metilação do gene *NFkB* nos grupos periodontite crônica (A) e controle (B), considerando os indivíduos fumantes. A barra preta representa a mediana referente às taxas de DNA metilado, a barra branca representa a mediana das taxas de DNA não metilado e a barra cinza representa a mediana das taxas de metilação parcial.

Nos indivíduos não fumantes, não houve diferença significativa do percentual de DNA não metilado ($p=0,610$) e metilado ($p=0,860$) entre os grupos. O mesmo foi observado em relação aos fumantes (DNA metilado $p=0,579$; DNA não metilado $p=0,579$). O perfil não metilado foi um evento comum em todos os grupos, independente do hábito de fumar, com percentual de DNA não metilado maior de 98%.

Em relação aos não fumantes, nenhuma correlação significativa foi encontrada considerando a porcentagem de DNA não metilado e o número de células inflamatórias (periodontite crônica $p=0,287$, $r=0,250$; controle $p=0,633$; $r=-0,117$), e também em relação aos parâmetros clínicos (PS: $p=0,549$, $r=0,142$; NIC: $p=0,561$; $r=0,138$). O mesmo foi observado em relação aos fumantes (Periodontite: células inflamatórias $p=0,881$, $r=0,055$; PS: $p=0,510$, $r=0,237$; NIC: $p=0,310$, $r=0,358$; Controle: células inflamatórias $p=0,603$; $r=-0,188$).

4.3.2.2 Transcrição de *NFκB*

Considerando os indivíduos não fumantes, o grupo controle apresentou uma maior transcrição do gene *NFκB* comparado ao grupo periodontite crônica ($p=0,008$) **Figura 15**. No grupo periodontite crônica nenhuma correlação foi observada com os níveis de transcrição do *NFκB* (percentual de DNA não metilado $p=0,992$; $r=0,003$; número de células inflamatórias $p=0,696$, $r=-0,110$; PS: $p=0,371$, $r=-0,249$; NIC: $p=0,310$, $r=-0,281$). No grupo controle também não houve correlação significativa entre os níveis de transcrição e o percentual de DNA não metilado ($p=0,311$; $r=-0,320$) e o número de células inflamatórias ($p=0,155$; $r=-0,386$).

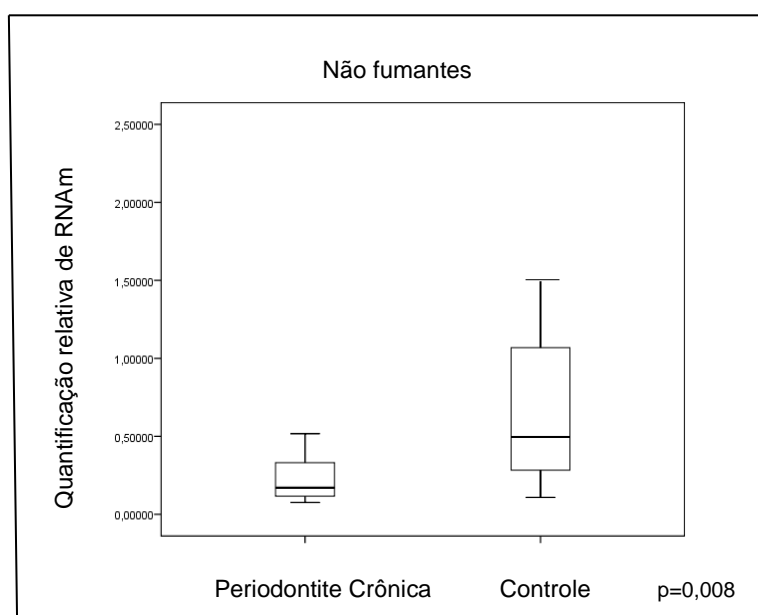


Figura 15: Comparação do nível de transcrição do *NFκB* entre os grupos periodontite crônica e controle em não fumantes.

Considerando os indivíduos fumantes, não houve diferença entre os níveis de transcrição do *NFκB* comparando o grupo periodontite crônica e controle ($p=0,076$). No grupo de periodontite crônica nenhuma correlação foi observada com os níveis de transcrição do *NFκB* (percentual de DNA não metilado $p=0,423$; $r=-0,331$; número de células inflamatórias $p=0,131$,

$r=0,355$; $PSp=0,387$, $r=-0,356$; NIC $p=0,456$, $r=-0,309$). No grupo controle também não houve correlação significativa entre os níveis de transcrição e o percentual de DNA não metilado ($p=0,381$; $r=0,333$), e o número de células inflamatórias ($p=0,603$; $r=-0,188$).

4.3.3 Genes *DNMTs*

4.3.3.1 DNMT1

Os níveis de transcritos da DNMT1 nos grupos periodontite e controle estão representados na Figura 16.

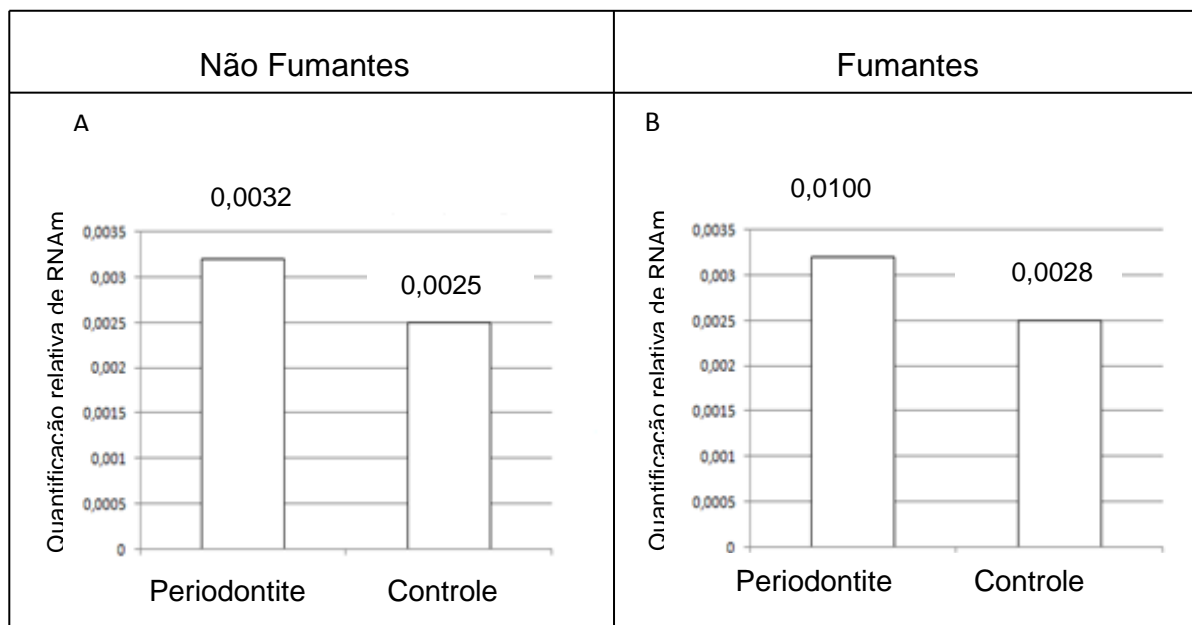


Figura 16: Níveis de DNMT1 no grupo periodontite e controle, considerando os não fumantes (A) e os fumantes (B).

Não foi observada diferença nos níveis de transcrição do gene *DNMT1* entre os grupos periodontite crônica e controle, tanto em não fumantes ($p=0,982$) quanto em fumantes ($p=0,277$). Não houve diferença nos níveis de transcrição entre os fumantes e os não fumantes no grupo periodontite ($p=0,357$) e no controle ($p=0,973$).

Em relação aos parâmetros avaliados, verificou-se uma correlação negativa entre os níveis de transcrição de DNMT1 e o número de células inflamatórias ($p=0,013$; $r=-0,625$) no grupo periodontite crônica não fumante **Figura 17**. Não foram observadas outras correlações tanto no grupo periodontite (não fumante: profundidade de sondagem $p=0,732$; $r=-0,097$ e NIC $p=0,772$; $r=-0,082$; fumante: número de células inflamatórias $p=0,736$; $r=0,143$, profundidade de sondagem $p=0,329$; $r=0,398$ e NIC $p=0,460$; $r=0,307$) quanto no grupo controle (não fumante: número de células inflamatórias $p=0,077$; $r=0,311$ e fumante: número de células inflamatórias $p=0,092$; $r=0,594$).

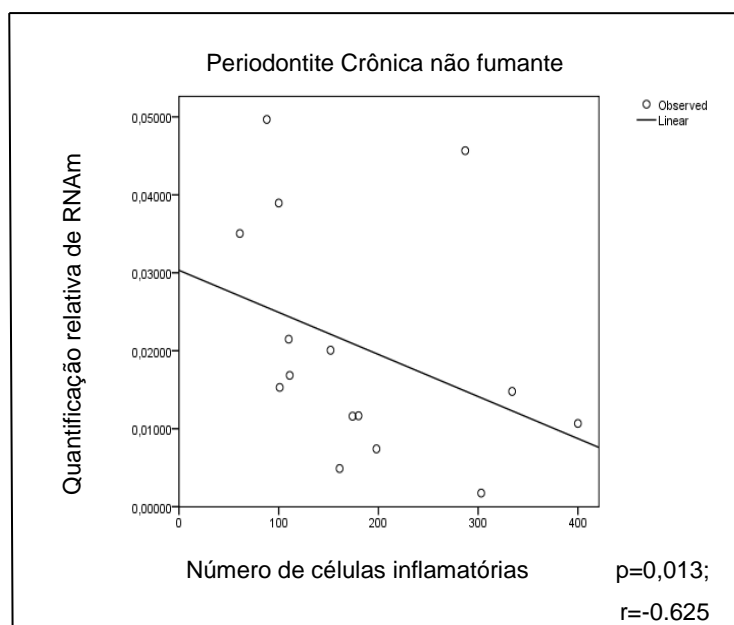


Figura 17: Correlação negativa entre os níveis de transcrição de DNMT1 e número de células inflamatórias no grupo periodontite crônica não fumante.

4.3.3.2 DNMT3A

Os níveis de transcritos da DNMT3A nos grupos periodontite e controle estão representados na **Figura 18**.

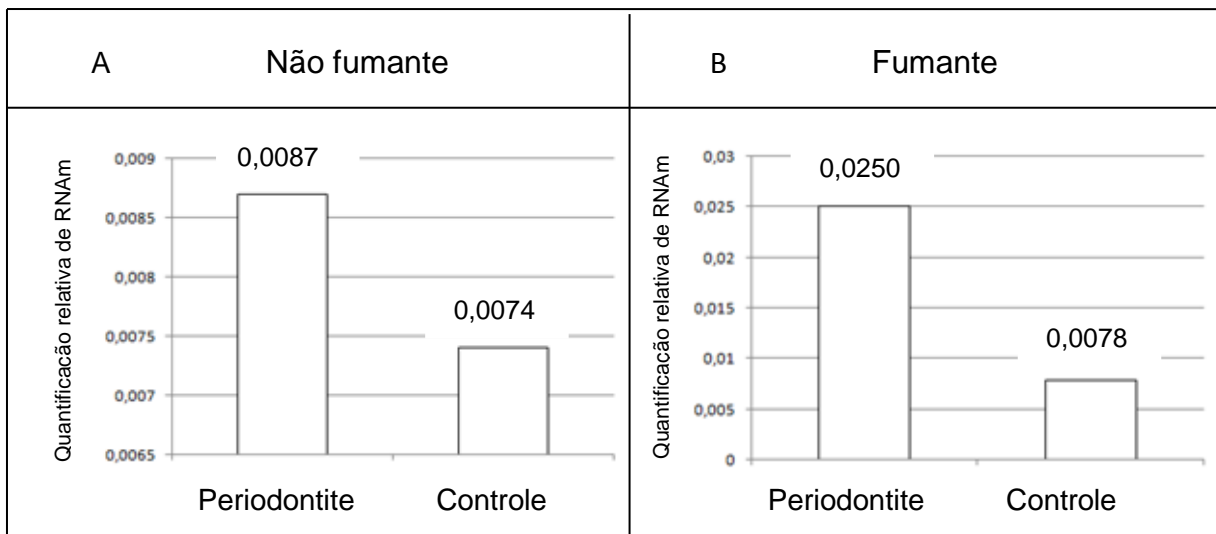


Figura 18: Níveis de DNMT3A no grupo periodontite e controle, considerando os não fumantes (A) e os fumantes (B).

Não foi observada diferença nos níveis de transcrição do gene *DNMT3A* entre os grupos de periodontite crônica e controle, tanto nos não fumantes ($p=0,339$) quanto nos fumantes ($p=0,093$). Considerando o grupo periodontite crônica, observou-se uma maior expressão de DNMT3A nos fumantes comparado aos não fumantes ($p=0,012$) **Figura19**. No grupo controle não foi observada diferença entre os fumantes e os não fumantes ($p=0,815$).

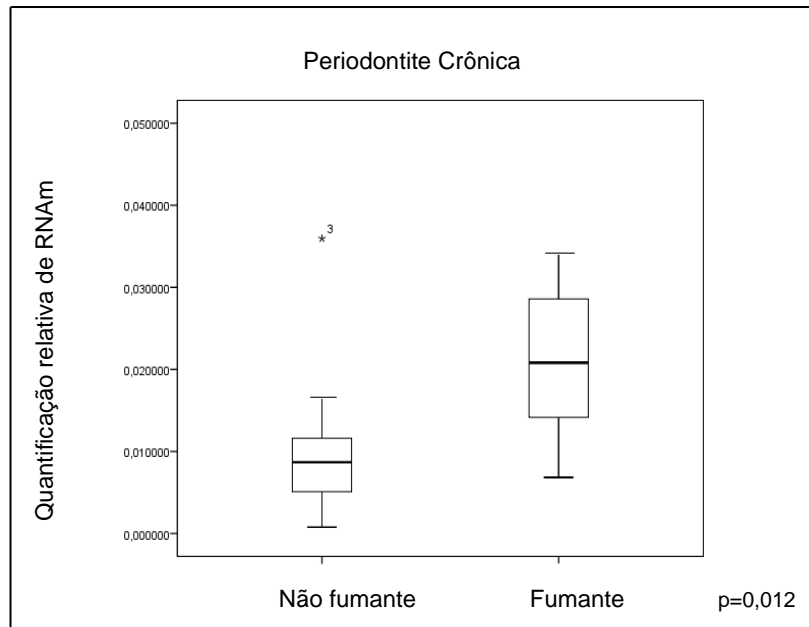


Figura 19: Níveis dos transcritos de DNMT3A no grupo periodontite considerando o tabagismo.

Em relação aos demais parâmetros, observou-se correlação positiva entre a transcrição de DNMT3A e a profundidade de sondagem no grupo de periodontite crônica não fumante ($p=0,001$; $r=0,750$) **Figura 20**. Não foram observadas outras correlações tanto no grupo periodontite (não fumante: número de células inflamatórias $p=0,558$; $r=0,164$, NIC $p=0,098$; $r=0,443$; fumante: número de células inflamatórias $p=0,097$ $r=0,601$, PS: $p=0,627$; $r=0,205$ e NIC $p=0,599$; $r=0,221$), quanto no grupo controle (não fumante: número de células inflamatórias $p=0,117$; $r=0,457$ e fumante: número de células inflamatórias $p=0,262$; $r=-0,418$).

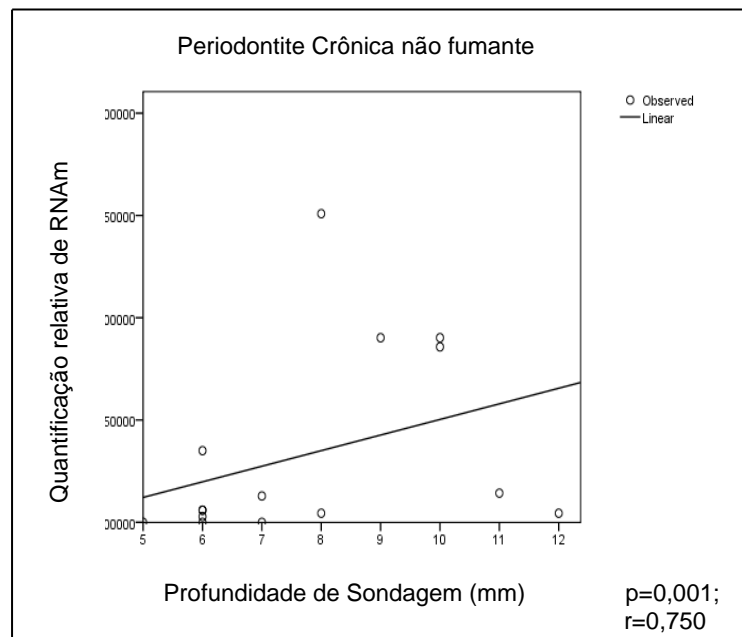


Figura 20: Correlação positiva entre os níveis de transcrição da DNMT3A e a profundidade de sondagem no grupo de periodontite crônica não fumante.

4.3.3.3 DNMT3B

Os níveis de transcritos da DNMT3B nos grupos periodontite e controle estão representados na **Figura 21**.

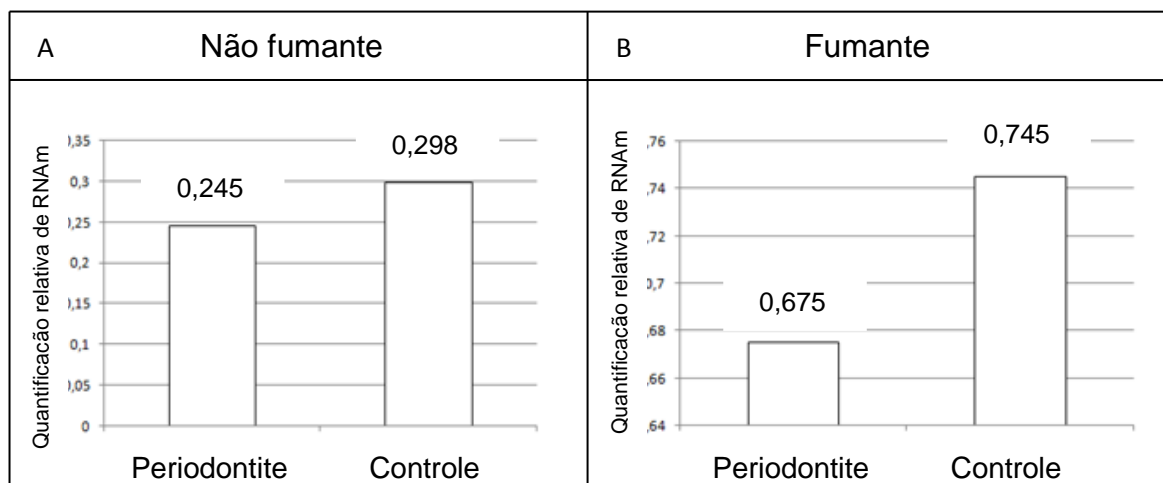


Figura 21: Níveis de DNMT3B no grupo periodontite e controle, considerando os não fumantes (A) e os fumantes (B).

Nos níveis de transcrição do gene *DNMT3B*, não foi observada diferença entre os grupos de periodontite crônica e controle, tanto nos não fumantes ($p=0,626$) quanto nos fumantes ($p=0,923$). Os fumantes apresentaram maiores níveis de *DNMT3B* comparado aos não fumantes tanto na periodontite crônica ($p=0,033$) quanto no controle ($p=0,004$) (**Figura 22A e B**, respectivamente).

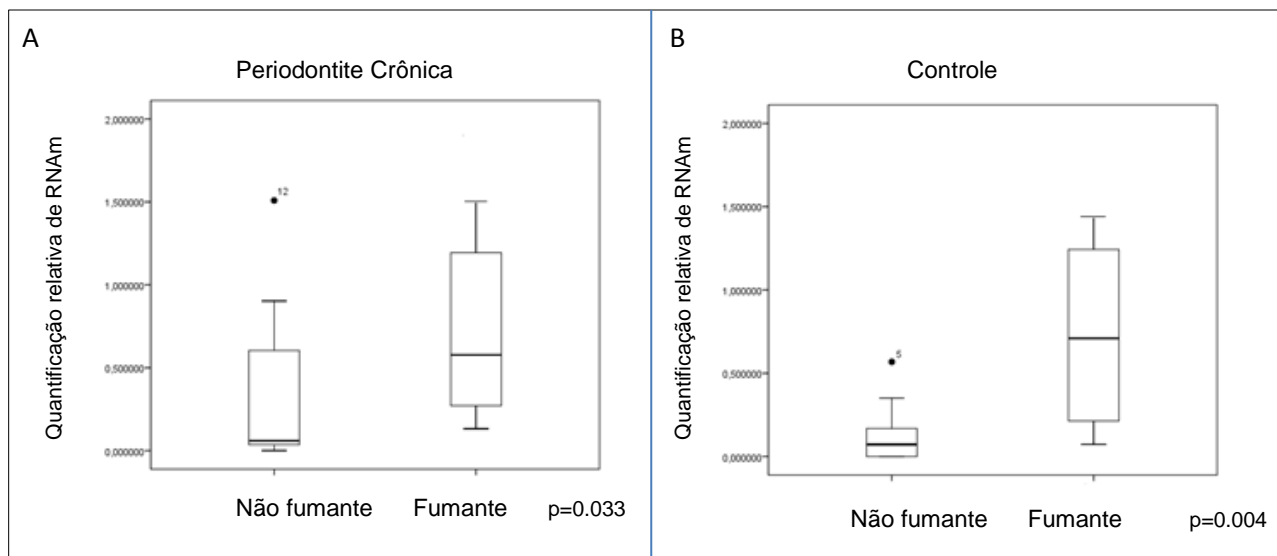


Figura 22: Níveis de transcritos de *DNMT3B* no grupos periodontite crônica (A) e controle (B), considerando o tabagismo

Em relação aos parâmetros avaliados, observou-se correlação positiva entre a transcrição de *DNMT3B* e o NIC no grupo periodontite crônica não fumante ($p=0,043$; $r=0,529$) **Figura 23**. Não foram observadas outras correlações tanto no grupo periodontite (não fumante: número de células inflamatórias ($p=0,632$; $r=-0,135$) e PS ($p=0,062$; $r=0,492$); fumante: número de células inflamatórias ($p=0,102$; $r=0,619$), PS ($p=0,910$; $r=0,048$) e NIC ($p=0,931$; $r=-0,037$), quanto no grupo controle (não fumante: número de células inflamatórias ($p=0,252$; $r=-0,342$) e fumante: número de células inflamatórias ($p=0,748$; $r=0,126$).

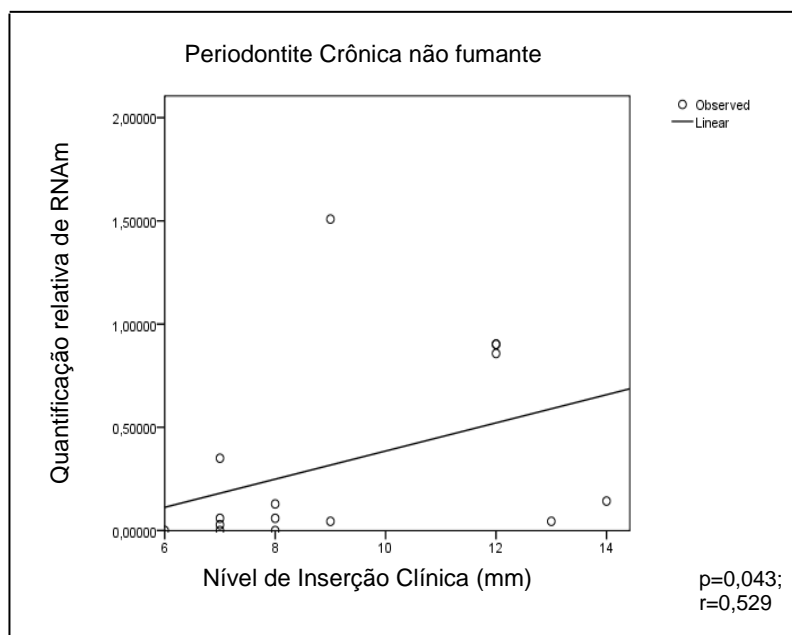


Figura 23: Correlação positiva entre os níveis de transcrição da DNMT3B e o nível de inserção clínica no grupo periodontite crônica não fumante.

5. DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença infecciosa, inflamatória, polimicrobiana de etiologia multifatorial, caracterizada pela destruição das estruturas de suporte e proteção do dente, podendo levar a perda do elemento dentário. Fatores relacionados ao hospedeiro, como os epigenéticos e a natureza da resposta imunológica têm sido identificados como importantes na determinação do desenvolvimento e gravidade da doença periodontal (Gomez et al., 2009; Cullinan e Seymour, 2009).

Pesquisas do padrão de metilação do DNA têm emergido como uma importante linha de estudo em várias doenças, incluindo a periodontite. Fatores relacionados à patogênese e/ou à progressão da doença periodontal, incluindo bactérias, inflamação e tabagismo são considerados moduladores da metilação do DNA, podendo afetar a resposta do hospedeiro (Zhang et al., 2010; Andia et al., 2010). Os eventos epigenéticos podem estar associados com diferentes perfis de respostas imunes, e isto tem aumentando o interesse da comunidade científica para associar esses eventos com as doenças inflamatórias (Richardson, 2003).

No presente trabalho, nenhuma diferença foi observada no padrão de metilação do gene CD14 entre os grupos analisados. O perfil de DNA não metilado foi um achado comum nos tecidos periodontais. Até o momento, não há relatos na literatura sobre o padrão de metilação do gene CD14 na doença periodontal. A metilação do CD14 tem sido investigada em outras doenças com perfil inflamatório, como na polpa dental humana e na asma. Cardoso et al. (2014) avaliaram o padrão de metilação do gene *CD14* em polpas dentárias humanas com e sem inflamação, e verificaram que o perfil de DNA não metilado é um evento comum nas polpas dentárias humanas. Munthe-Kaas et al. (2010) realizaram um estudo longitudinal e verificaram que crianças com idade entre 2 a 10 tiveram uma hipermetilação pequena do gene CD14 no sangue e que após os 10 anos ocorreu uma hipometilação do gene. Os autores afirmam que as mudanças epigenéticas podem afetar a suscetibilidade a

doença em um contexto relacionado com a idade. Slaats et al. (2012) avaliaram amostras de placentas e observaram que a metilação do *CD14* foi significativamente menor em gestantes que moravam em fazendas comparando as que moram em cidades. Os autores afirmam que essa regulação epigenética na placenta pode estar envolvida em um efeito protetor ao desenvolvimento de alergias nessas gestantes que vivem em ambiente rural.

Uma correlação negativa foi observada entre a frequência do percentual de DNA não metilado do *CD14* e o número de células inflamatórias no grupo periodontite crônica não fumante. Na inflamação, as células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, induzem a formação de nitrogênio e oxigênio reativos que podem causar danos ao DNA (Valinluck et al., 2006). Esse dano pode causar alterações no reconhecimento do DNA pelas DNMTs e alterar o padrão de metilação.

Em relação à transcrição do gene *CD14*, em não fumantes observou-se maiores níveis de transcritos no grupo periodontite comparado ao controle. O aumento da transcrição do *CD14* foi descrito em diferentes doenças inflamatórias (Levanet et al. 2001, Arroyo-Espliguero et al., 2004, Dahmer et al. 2005, Munthe-Kasset et al. 2010), assim como na periodontite (Nicu et al. 2009; Raunio et al. 2009). O aumento dos níveis de transcrição observado no grupo periodontite não fumante pode ter sido influenciado pelos altos níveis de hipometilação encontrados nas amostras avaliadas deste grupo, cerca de 80%. Contudo, não foram observadas correlações do perfil de metilação de *CD14* e os níveis de transcritos no presente trabalho. Até o momento não há trabalhos na literatura mostrando a relação entre o padrão de metilação desse gene e a transcrição na periodontite.

Em relação ao gene *NFkB*, um perfil de DNA não metilado foi verificado em todos os grupos estudados. Nenhuma diferença do perfil de metilação foi observada entre os grupos, sugerindo não haver associação entre o padrão de metilação do *NFkB* e a periodontite crônica. Até o presente momento não há outros trabalhos na literatura que avaliaram o padrão de metilação do *NFkB* na doença periodontal.

Nos indivíduos não fumantes, o grupo controle apresentou uma maior transcrição de *NFkB* comparado com o de periodontite crônica. Pesquisas mostrando o papel do NFkB na doença periodontal são escassas. Marconcini et al.(2002) não verificaram nenhuma diferença nos níveis de expressão do *NFkB* em leucócitos de indivíduos com periodontite comparado com os sem periodontite. Em nosso trabalho, os menores níveis de transcrição do *NFkB* no grupo periodontite pode ser baseado no fato dos indivíduos terem sido submetidos a terapia periodontal básica antes da cirurgia seguindo os protocolos éticos do tratamento periodontal. Apesar de não ter sido significativo ($p=0,061$), o grupo periodontite crônica não fumante apresentou um pequeno aumento nos níveis de metilação do DNA quando comparado ao controle não fumante, isso pode ter contribuído para essa maior expressão do *NF-Kb* no grupo controle. Estudos adicionais são necessários para investigar essa hipótese.

Em relação às DNMTs, não encontramos diferença na transcrição dos genes *DNMT1*, *DNMT3A* e *B* entre os grupos avaliados (controle x periodontite). Esses dados são corroborados com os de Pereira et al. (2013) que também não verificaram diferença nos níveis de transcrição da *DNMT1* e *DNMT3A* em amostras de biópsias gengivais de indivíduos com e sem periodontite. Contudo, Yin & Chung (2011) mostraram que a *P.gingivalis* pode causar um decréscimo da expressão gênica da *DNMT1* em células do epitélio oral. Até o presente momento não existem estudos que avaliaram os níveis de transcrição da *DNMT3B* na periodontite. Zheng et al. (2016) observaram que a diminuição dos níveis de DNMT3B pode acelerar a progressão da leucemia. Robaina et al. (2015) mostraram no Linfoma de Burkitt uma maior expressão dessa enzima.

Nos indivíduos não fumantes com periodontite crônica, uma correlação negativa foi verificada entre os níveis de transcrição da DNMT1 e o número de células inflamatórias. Como citado anteriormente, as células inflamatórias induzem a formação de oxigênio e nitrogênio reativos que causam danos ao DNA diminuindo o reconhecimento pela DNMT1 (Valinluck et al., 2006). Estudos adicionais são necessários para elucidar se a diminuição da DNMT1 seja um mecanismo de “feedback” pela presença dos produtos da inflamação. Neste mesmo grupo foram observadas correlações positivas dos níveis de transcritos

das DNMT3A e B com parâmetros de gravidade da doença periodontal (profundidade de sondagem e nível de inserção clínica, respectivamente). O aumento dos níveis de transcrição das DNMT3A e DNMT3B pode induzir ao aumento da metilação (*de novo*) e este interferir na transcrição de genes que atuam na resposta inflamatória na periodontite contra o estímulo periodontopatogênico, aumentando a gravidade da doença periodontal. Até o presente momento não há outros trabalhos na literatura que avaliaram essas correlações.

O cigarro causa alterações genéticas no DNA (Hecht, 1999). Tem sido demonstrado que a exposição ao tabaco induz alterações epigenéticas, promovendo hipermetilação nos genes supressor de tumor (Belinsky et al., 2003; Fujiwara et al., 2005) e pró- apoptóticos (Pulling et al., 2004). Contudo, há relato que o fumo pode causar uma hipometilação global (Smith et al., 2007). No presente estudo, observou-se que o fumo influencia o padrão de metilação do gene *CD14* no grupo controle, aumentando as taxas de hipometilação. Apesar dos altos níveis de hipometilação verificado nos fumantes, nenhuma correlação significativa com os níveis de transcrição foi detectada. Indivíduos fumantes mostraram maior transcrição de *CD14* comparado aos não fumantes, tanto na periodontite quanto no controle. Como não houve correlação entre hipometilação e transcrição, possivelmente os níveis de hipometilação encontrados não foram suficientes para induzir modificações nos níveis de transcrição ou outros fatores estão interferindo nos níveis de transcrição.

Um aumento na transcrição de DNMT3A e B em fumantes foi observado em nosso estudo. Nenhuma associação foi observada entre o hábito tabagista e os níveis de transcrição da DNMT1. Não há na literatura outros trabalhos que mostram associação entre o tabagismo e a DNMTs na doença periodontal. O aumento da expressão da DNMT1 influenciado pelo tabagismo no câncer de mama foi mostrado por Burbee et al. (2001). Liu et al. (2007) mostraram que a expressão da *DNMT3B* é diminuída pelo cigarro, já a da DNMT1 e DNMT3A aumentada em vários tipos de câncer.

O presente estudo sugere pela primeira vez que a hipometilação dos genes *CD14* e *NFkB* é uma ocorrência comum nos tecidos periodontais. O tabagismo, importante fator de risco da doença periodontal, parece influenciar nos níveis de transcrição de *CD14* e das *DNMT3A* e *B*, assim como no perfil de metilação de *CD14*. Estudos adicionais são necessários para determinar a relevância funcional dos perfis observados na doença periodontal e para compreender os mecanismos epigenéticos envolvidos na patogênese da doença.

6. CONCLUSÕES

- Um perfil de DNA não metilado dos genes *CD14* e *NFκB* foram verificados nos tecidos periodontais;
- Não houve associação de um perfil de metilação dos genes *CD14* e *NFκB* com a periodontite crônica;
- Não foram observadas correlações entre os perfis de metilação e os níveis de transcritos dos genes *CD14* e *NFκB*;
- O tabagismo parece influenciar o padrão de metilação e a transcrição de *CD14*, assim como na transcrição de *DNMT3A* e *B*;
- Não houve diferença nos níveis de transcrição da *DNMT1* entre os grupos avaliados;
- Maiores níveis de transcrição das *DNMT3A* e *DNMT3B* foram observados no grupo periodontite crônica fumante, e isto pode aumentar a taxa de metilação *de novo*, nos indivíduos desse grupo e ter implicância na patogênese e progressão da doença;
- Estudos adicionais são necessários para determinar a relevância funcional dos perfis observados na doença periodontal e para compreender os mecanismos epigenéticos envolvidos na patogênese da doença.

7. REFERÊNCIAS

1. Adcock IA, Tsaprouni L, Bhavsar P, Ito K. Epigenetic regulation of airway inflammation. **Curr Opin Immunol**. 2007;19:694–700.
2. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**.2000;406:782–787.
3. Alcamo E, Hacohen N, Schulte LC, Rennert PD, Hynes RO, Baltimore, D. Requirement for the NF- κ B family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. **Journal of Experimental Medicine**. 2002; 195:233–244.
4. Albandar JM, Tinoco EMB. Global epidemiology of periodontal disease in children and young persons. **Periodontol 2000**. 2002 Abril; 29: 153-176.
5. Alegría-Torres JA, Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and lifestyle. **Epigenomics**. 2011 Jun;3(3):267-77.
6. de Faria Amormino SA, Arão TC, Saraiva AM, Gomez RS, Dutra WO, da Costa JE, de Fátima Correia Silva J, Moreira PR. Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. **Hum Immunol**. 2013 Set;74(9):1231-6.
7. Andia DC, de Oliveira NF, Casarin RC, Casati MZ, Line SR, de Souza AP. DNA methylation status of the IL8 gene promoter in aggressive periodontitis. **J Periodontol**. 2010 Set;81(9):1336-41.
8. Andia DC, Planello AC, Portinho D, da Silva RA, Salmon CR, Sallum EA, Junior FH, de Souza AP. DNA methylation analysis of SOCS1, SOCS3, and LINE-1 in microdissected gingival tissue. **Clin Oral Investig**. 2015 Dec;19(9):2337-44.
9. Arand J, Spieler D, Karius T, et al. In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. **PLoS Genet**. 2012; 8:e1002750.
10. Armitage, G C. Periodontal Diseases: Diagnosis. **Ann Periodontol**. 1996 Nov; 1(1): 37-215.
11. Armitage, GC. Development of a classification system for periodontal disease and conditional. **Ann Periodontol**. 1999; 4(1):16,1999.

12. Arroyo-Espliguero R, Avanzas P, Jeffery S, Kaski JC. CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events? **Heart**. 2004;90(9):983-8. Review.
13. Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci**. 2002 Feb; 59(2):241-57.
14. Barros SP, Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. **J Dent Res**. 2009 Maio;88(5):400-8.
15. Barros SP, Offenbacher S. Modifiable risk factors in periodontal disease: epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response. **Periodontol 2000**. 2014 Feb;64(1):95-110.
16. Bartold PM., McCulloch, CAG., Narayanan, AS. Pitaru, S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. **Periodontology 2000**. 2000 Out; 24: 253 – 269.
17. Barres R, Osler ME, Yan J, et al. Non-CpG methylation of the PGC-1alpha promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. **Cell Metab**. 2009;10:189–98.
18. Bas S, Gauthier BR, Spenato U, Stingelin S, Gabay C. CD 14 is an acute-phase protein. **J Immunol**. 2004;172: 4470–4479.
19. Bazil V, Baudys M, Hilgert I, Stefanová I, Low MG, Zbrozek J, Horejsí V. Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14. **Mol Immunol**. 1989 Jul;26(7):657-62.
20. Baylin, SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol**. 2005 Dez; 2(1): 4-11.
21. Belinsky SA, Klinge DM, Stidley CA, Issa JP, Herman JG, March TH, Baylin SB. Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. **Cancer Res**. 2003 Nov 1;63(21):7089-93.
22. Bell JT, Pai AA, Pickrell JK, Gaffney DJ, Pique-Regi R, Degner JF, Gilad Y, Pritchard JK. DNA methylation patterns associate with genetic and

- gene expression variation in HapMap cell lines. **Genome Biol.** 2011;12(6):405.
23. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev.** 2002 Jan; 1;16(1):6-21.
 24. Breitlig LP, Yang R, Bernhard K, Burwinkel B, Brenner H. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27k discovery and replication. **The americ. J Human Gen.** 2011 Abril; 88:450-457.
 25. Burbee DG, Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Bader S, Sekido Y, Latif F, Milchgrub S, Toyooka S, Gazdar AF, Lerman MI, Zabarovsky E, White M, Minna JD. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. **J Natl Cancer Inst.** 2001 2;93(9):691-9.
 26. Carayol N, Chen J, Yang F, Jin T, Jin L, States D, Wang CY. A dominant function of IKK/NF-kappaB signaling in global lipopolysaccharide-induced gene expression. **J Biol Chem.** 2006 Out; 13;281(41):31142-51.
 27. Cardoso FP, de Faria Amormino SA, Dutra WO, Ribeiro Sobrinho AP, Moreira PR. Methylation pattern of the CD14 and TLR2 genes in human dental pulp. **J Endod** 2014 40(3):384-6.
 28. Costello JF, Plass C. Methylation matters. **J Med Genet.** 2001 Maio;38(5): 285-303.
 29. Cullinan MP, Ford PJ, Seymour GJ. Periodontal disease and systemic health: current status. **Aust Dent J.** 2009Sep;54 Suppl 1:S62-9.
 30. Dahmer MK, Randolph A, Vitali S, Quasney MW. Genetic polymorphisms in sepsis. **Pediatr Crit Care Med.** 2005; 6(3): 61-73.
 31. Daniel M, Tollefsbol TO. Epigenetic linkage of aging, cancer and nutrition. **J Exp Biol.** 2015 Jan; 1;218(Pt 1):59-70.
 32. Deplus R, Brenner C, Burgers WA, Putmans P, Kouzarides T, de Launoit Y, Fuks F. Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. **Nucleic Acids Res** 2002; 30:3831–3838
 33. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target

- promoters by an oncogenic transcription factor. **Science**. 2002; 295:1079–1082.
34. Egger GS, Jeong SG, Escobar CC, Cortez TW, Li Y, Saito CB, Yoo PA, Jones G, Liang. Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 2006;103:14080–14085
 35. Ekstrom AM, Held M, Hansson LE, Engstrand L, Nyren O. Helicobacter pylori in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. **Gastroenterology**. 2001;121:784–9.
 36. Espada J. Non-catalytic functions of DNMT1. **Epigenetics**. 2012;7:115–118
 37. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. **J Pathol**. Jan 2002;196(1):1-7.
 38. Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, Silva AJ, Fan G. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. **Nat Neurosci**. 2010;13: 423–430.
 39. Fitzpatrick DR, Wilson CB. Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. **Clin Immunol**. 2003 Oct;109(1):37-45.
 40. Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, Nishii K, Matsuo K, Hotta K, Kozuki T, Aoe M, Kiura K, Ueoka H, Tanimoto M. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. **Clin Cancer Res**. 2005;11(3):1219-25.
 41. Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. **Annu Rev Biochem**. 2005;74:481–514.
 42. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH. Methylation of Trna^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. **Science**. 2006 Jan; 20;311(5759):395-8.
 43. Gomez RS, Dutra WO, Moreira PR. Epigenetics and periodontal disease:future perspectives. **Inflamm. Res**. Oct 2009; 58(10):625-629.
 44. Gopisetty G, Ramachandran K, Singal R. DNA methylation and apoptosis. **Mol Immunol** 2006; **43**(11):1729-40.

45. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. **Periodontol** 2000. 1994; 5:78-111.
46. Hahn MA, Hahn T, Lee DH, Esworthy RS, Kim BW, Riggs AD, Chu FF, Pfeifer GP. Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. **Cancer Research**. 2008; 68:10280–10289.
47. Hansen RS, Stoger R, Wijmenga C, Stanek AM, Canfield TK, Luo P, Matarazzo MR, D'Esposito, Feil R, Gimelli G, Weemaes CM, Laird CD, Gartler SM. Escape from gene silencing in ICF syndrome: Evidence for advanced replication time as a major determinant. **Hum. Mol. Genet**. 2000; 9:2575–2587.
48. Hayashi J, Masaka T, Ishikawa I. Increased levels of soluble CD14 in sera of periodontitis patients. **Infect Immun**. 1999 Jan;67(1):417-20.
49. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. **Cell**. 2008 Feb; 8;132(3):344-62.
50. Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, Hijita N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL, Goyert SM. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. **Immunity**. 1996; 4: 407-414.
51. Heller H, Kämmer C, Wilgenbus P, Doerfler W. Chromosomal insertion of foreign (adenovirus type 12, plasmid, or bacteriophage lambda) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1995 Jun 6;92(12):5515-9.
52. Hecht SS. Tobaccosmoke carcinogens and lung cancer. **J Natl Cancer Inst**. 1999 Jul 21;91(14):1194-210.
53. Hellman A, Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. **Science**. 2007 Feb 23;315(5815):1141-3.
54. Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. **Cell Mol Life Sci**. 2004 Oct;61(19-20):2571-87
55. Hornef MW, Bogdan C. The role of epithelial Toll-like receptor expression in host defense and microbial tolerance. **J. Endotoxin Res**. 2005; 11(2):124-8.
56. Holliday R. DNA methylation and epigenetic inheritance. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 1990 Jan 30;326(1235):329-38.

57. Huang J, Okuka M, Lu W, Tsibris JC, McLean MP, Keefe DL, Liu L. Telomere shortening and DNA damage of embryonic stem cells induced by cigarette smoke. **Reprod Toxicol**. 2013 Jan;35:89-95.
58. Ishida K, Kobayashi T, Ito S, Komatsu Y, Yokoyama T, Okada M, Abe A, Murasawa A, Yoshie H. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. **J Periodontol**. 2012 Jul;83(7):917-25.
59. Ishikawa I. Host in periodontal disease: a preview. **Periodontology 2000**. 2007; 43(1):9-13.
60. Jiang Z, Gerogel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, Huber M, Kalis C, Keck S, Galanos C, Freudenberg M, Beutler B. CD14 is required for MyD88 – independent LPS signaling. **Nat Immunol**. 2005; 6:565-70.
61. Johnson IT, Belshaw NJ. Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. **Food Chem Toxicol**. 2008 Abril; 46(4):1346-59.
62. Jones PA. An epigenetic approach for finding tumor suppressors. **Cell Cycle**. 2003 Fev; 2(1): 25-6.
63. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. **ChemBiochem**. 2011; 12: 206–222
64. Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. Signaling via NF- κ B in the nervous system. **Biochim Biophys Acta**. 2005; 1745:287–299
65. Kareta MS, Botello ZM, Ennis JJ, Chou C, Chédin F. Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. **J Biol Chem**. 2006 Set; 8;281(36):25893-902.
66. Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. **J Clin Microbiol**. 2003 Feb;41(2):558-63.
67. Kiani J, Grandjean V, Liebers R, Tuorto F, Ghanbarian H, Lyko F, Cuzin F, Rassoulzadegan M. RNA-mediated epigenetic heredity requires the cytosine methyltransferase Dnmt2. **PLoS Genet**. 2013 Mai;9(5): e1003498

68. Kielian TL, Blecha F. CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review. **Immunopharmacology** 1995; 29:187-205.
69. Kim NY, Kim JH, Lee YH, Lee EJ, Kim J, Lim Y, Chong Y, Ahn JH. O-Methylation of flavonoids using DnrK based on molecular docking. **J Microbiol Biotechnol**. 2007 17;12: 1991-5.
70. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. **Periodontol 2000**, 2001 Feb;25(1):8-20.
71. Klose R, Bird A. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends Biochem Sci**. 2006 Feb; 31(2): 89-97.
72. Knapowski J., Wieczorowska-Tobis, K. and Witowski, J. Pathophysiology of 721 ageing. **J Physiol Pharmacol**. 2002; 53:135-46.
73. Kojima A, Kobayashi T, Ito S, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter methylation in Japanese adults with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis. **J Periodontal Res** 2016; 51(3): 359-65.
74. Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin Stine O, Howard TD, Whittaker PA, Meyers DA, Postma DS, Bleeker ER. Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. **Am J Respir Crit Care Med**. 2001 Mar; 163(4):965-969.
75. Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. **J Periodontol**. 2008 Ago; 79(8):1560-8.
76. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer**. 2003; 3(4): 253-66.
77. Larsson L, Thorbert-Mros S, Rymo L, Berglundh T. Influence of epigenetic modifications of the interleukin-10 promoter on IL10 gene expression. **Eur J Oral Sci**. 2012Feb;120(1):14-20.
78. Lee EW, D'Alonzo GE. Cigarette smoking, nicotine addiction, and its pharmacologic treatment. **Arch Intern Med**. 1993 Jan; 11;153(1):34-48.
79. Levan TD, Bloom JW, Bailey TJ, Karp CI, Halonen M, Martinez FD, Vercelli D. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. **J Immunol**. 2001; 167:5838-44.
80. Li H, Rauch T, Chen ZX, Szabó PE, Riggs AD, Pfeifer GP. The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A

- interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells. **J Biol Chem.** 2006 Jul 14; 281(28):19489-500.
81. Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics.** 2002;18:1427-1431.
82. Li Y, Daniel M, Tollefsbol TO. Epigenetic regulation of caloric restriction in aging. **BMC Med.** 2011 Aug; 25;9:98.
83. Liu B, Yang Y, Chernishof V, Loo RR, Jang H, Tahk S, Yang R, Mink S, Shultz D, Bellone CJ, et al.. Proinflammatory stimuli induce IKK α -mediated phosphorylation of PIAS1 to restrict inflammation and immunity. *Cell.* 2007 129:903–914
84. Livak KJ, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. **Methods** 2001; 25:402–8.
85. L e H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. **J Periodontol.** 1965 Mai-Jun; 36: 177-87.
86. Loo WT, Jin L, Cheung MN, Wang M, Chow LW. Epigenetic change in E-cadherin and COX-2 to predict chronic periodontitis. **J Transl Med.** 2010 Nov; 4(8):110.
87. Lopez J, Percharde M, Coley HM, Webb A, Crook T. The context and potential of epigenetics in oncology. **Br J Cancer.** 2009 Feb; 24;100(4): 571-577.
88. Lopez NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. **J Periodontol.** 2002; 73 (8): 911-24.
89. Maegawa S, Hinkal G, Kim HS, Shen L, Zhang L, Zhang J, et al. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. **Genome Res.** 2010;20(3):332–40.
90. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, Arii K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D, Sugimura T, Ichinose M, Ushijima T. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. **Clin Cancer Res.** 2006 Feb; 12(3): 989-95.

91. Malek R, Borowicz KK, Jargiello M, Czuczwar SJ. Role of nuclear factor κ B in the central nervous system. **Pharmacological Reports**. 2007; 59, 25-33
92. Malik K, Brown KW. Epigenetic gene deregulation in cancer. **Br J Cancer**. 2000; 83(12):1583–810.1054
93. Mauro D, Tord B, Ann-Marie H, Mirjana HZ, Lars AH, Leonid P. Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNFA and Q551R IL-4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol*. 2005 Maio; 32(5):474-9.
94. Meffert, M.K. e Baltimore, D. Physiological functions for brain NF- κ B. **TRENDS in Neurosciences**. 2005; 28: 27–43.
95. Mercer BA, Wallace AM, Brinckerhoff CE, D'Armiento JM. Identification of a cigarette smoke-responsive region in the distal MMP-1 promoter. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**. 2009; 404–12 10.1165
96. Mercurio, F., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Young, D.B., Li, J.W., Pascual, G., Motiwala, A., Zhu, H., Mann, M. e Manning, A.M. I κ B kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. **Molecular Cell Biology**. 1999; 19, 1526–1538.
97. Miao D, Godovikova V, Qian X, Seshadrinathan S, Kapila YL, Fenno JC. *Treponema denticola* upregulates MMP-2 activation in periodontal ligament cells: interplay between epigenetics and periodontal infection. **Arch Oral Biol**. 2014 Out; 59(10):1056-64.
98. Milward MR, Chapple ILC, Wright HJ, Millard JL, Matthews JB, Cooper PR. Differential activation of NF- κ B and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens. **Clin Exp Immunol**. 2007;148:307–324
99. Miremadi A, Oestergaard MZ, Pharoah PD, Caldas C. Cancer genetics of epigenetic genes. **Hum Mol Genet**. 2007; 16: R28–R49
100. Mohamed MR, McFadden G. NF κ B inhibitors: strategies from poxviruses. **Cell Cycle**. 2009 Oct 1;8(19):3125-32.
101. Mukai T, Sekiguchi M. Gene silencing in phenomena related to DNA repair. **Oncogene**. 2002 Dez; 16, 21(58): 9033-9042.

102. Munthe-Kaas MC, Torjussen TM, Gervin K, Lodrup Carlsen KC, Carlsen KH, Granum B, Hjorthaug HS, Undlien D, Lyle R. CD14 polymorphisms and serum CD14 levels through childhood: a role for gene methylation? **J Allergy Clin Immunol**. 2010 Jun; 125(6):1361-8.
103. Murphy SK, Adigun A, Huang Z, Overcash F, Wang F, Jirtle RL, Joellen S, Schildkraut, Amy P, Murtha Edwin S, Iversen, Cathrine Hoyo. Gender-specific methylation differences in relation to prenatal exposure to cigarette smoke. **Gene**. 2012; 494 36–43 .10.1016
104. Murrel A, Rakyan V, Beck S. From genome to epigenome. **Hum Mol Genet**. 2005 Abril; 14(1); R3-R10.
105. Nabel G, Baltimore D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. **Nature**. 1987 Abr 16-22; 326 (6114): 711-3.
106. Nakajima Y, Furuichi Y, Biswas KK, Hashiguchi T, Kawahara K, Yamaji K, Uchimura T, Izumi Y, Maruyama I. Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF-kappaB pathway inhibition. **FEBS Lett**. 2006 Jan 23;580(2):613-9.
107. Nicu EA, Laine MI, Morre SA, Van Der Velden U, Loos BG. Soluble CD14 in periodontitis. **Innate Immun**. 2009;15: 121–128.
108. Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M, Ushijima T. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. **Cancer Res**. 2010; 70, 1430–1440.
109. Offenbacher S. Periodontal disease: pathogenesis. **Ann Periodontol**. 1996 Nov; 1(1): 821-878.
110. Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. Rethink Periodontal Inflammation. **J Periodontol**. 2008 Ago; 79(8): 1577-1584.
111. Okano M, Takebayashi S, Okumura K, Li E. Assignment of cytosine-5 DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b to mouse chromosome bands 12A2-A3 and 2H1 by in situ hybridization. **Cytogenet Cell Genet**. 1999; 86(3–4):333–410.
112. Oliveira NF, Damm GR, Andia DC, Salmon C, Nociti FH Jr, Line SR, De Souza AP DNA methylation status of the IL8 gene promoter in

- oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, 2009 Set; 36 (9): 719-715.
113. Oliveira NF, Andia DC, Planello AC, Pasetto S, Marques MR, Nociti FH Jr, Line SR, De Souza AP. TLR2 and TLR4 gene promoter methylation status during chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**. 2011 Nov;38(11): 975-83.
114. Olson KR. Carbon monoxide poisoning: mechanisms, presentation, and controversies in management. **J. Emerg. Med.** 1984; 1 233–243 10.
115. Page RC, Kornman KS. Pathogenesis of periodontitis. An introduction. **Periodontol 2000**. 1997 Jun. 14(1): 9-11.
116. de Camargo Pereira G, Guimarães GN, Planello AC, Santamaria MP, de Souza AP, Line SR, Marques MR. Porphyromonas gingivalis LPS stimulation downregulates DNMT1, DNMT3a and JMJD3 gene expression levels in human HaCaT Keratinocytes. **Clin Oral Invest**. 2013 Maio; 17(4): 1279-85
117. Pliushch G, Schneider E, Weise D, El Hajj N, Tresch A, Seidmann L, Coerdts W, Müller AM, Zechner U, Haaf T. Extreme methylation values of imprinted genes in human abortions and stillbirths. **Am. J. Pathol.** 2010; 176 1084–1090.
118. Pulling LC, Vuilleminot BR, Hutt JA, Devereux TR, Belinsky SA. Aberrant promoter hypermethylation of the death-associated protein kinase gene is early and frequent in murine lung tumors induced by cigarette smoke and tobacco carcinogens. **Cancer Res**. 2004 Jun 1;64(11):3844-8.
119. Rajendran G, Shanmuganandam K, Bendre A, Muzumdar D, Goel A, Shiras A. Epigenetic regulation of DNA methyltransferases: DNMT1 and DNMT3B in gliomas. **J Neurooncol**. 2011; 104(2):483-94.
120. Ramakrishnan P, Wang W, Wallach D. Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase. **Immunity**. 2004; 21, 477–489.
121. Raunio T, Knuutila M, Karttunen R, Vainio O, Tervonen T. Serum sCD14, polymorphism of CD14-260 and periodontal infection. **Oral Disease**. 2009;15: 484-489.

122. Richards EJ. Inherited epigenetic variation--revisiting soft inheritance. **Nat Rev Genet.** 2006 Maio;7(5):395-401.
123. Richardson B. DNA methylation and autoimmune disease. **Clin Immunol** 2003; 109(1):72-9.
124. Robaina MC, Mazzoccoli L, Arruda VO, Reis FR, Apa AG, de Rezende LM, Klumb CE. Deregulation of DNMT1, DNMT3B and miR-29s in Burkitt lymphoma suggests novel contribution for disease pathogenesis. **Exp Mol Pathol.** 2015Apr;98(2):200-7
125. Salnikow K, Costa M. Epigenetic mechanisms of nickel carcinogenesis. *J. Environ. Pathol Toxicol Oncol.* 2000; 19(3): 307-18.
126. Schaefer M, Pollex T, Hanna K, Tuorto F, Meusburger M, Helm M, Lyko F. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. **Genes Dev.** 2010; 24, 1590-1595.
127. Schaubert J, Oda Y, Büchau AS, Yun QC, Steinmeyer A, Zügel U, Bikle DD, Gallo RI. Histone acetylation in keratinocytes enables control of the expression of cathelicidin and CD14 by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **J Invest Dermatol.** 2008 Abr; 128(4): 816-24.
128. Scheidereit C. I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. **Oncogene.** 2006; 25, 6685–66705.
129. Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. **Periodontol 2000.** 2006; 40: 77-93.
130. Senftleben U. NF- κ B in critical diseases: a bad guy? **Intensive Care Med.** 2003 Nov; 29(11):1873-6.
131. Shen JX, Yakel JL. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. **Acta Pharmacol Sin.** 2009; 30 673–680 10.
132. Shiao YH, Crawford EB, Anderson LM, Patel P, Ko K. Allele-specific germ cell epimutation in the spacer promoter of the 45S ribosomal RNA gene after Cr(III) exposure. **Toxicol Appl Pharmacol.** 2005; 205(3): 290–296.
133. Shuto T, Furuta T, Oba M, Xu H, Li JD, Cheung J, Dieter, Gruenert C, Uehara A, Mary Suico A, Okiyoneda T, Kai K. Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory

response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. **The FASEB Journal**. 2006;20(6):782-4.

134.

135. Slaats GG, Reinius LE, Alm J, Kere J, Scheynius A, Joerink M. DNA methylation levels within the CD14 promoter region are lower in placentas of mothers living on a farm. **Allergy**. 2012 Jul. 67(7): 895-903.

136. Smith JW, Mogg A, Tafi E, Peacey E, Pullar IA, Szekeres P, Tricklebank M. Ligands selective for alpha4beta2 but not alpha3beta4 or alpha7 nicotinic receptors generalise to the nicotine discriminative stimulus in the rat. **Psychopharmacology**2007; 190(2):157-70.

137. Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. **J Dent Res**. 1970; 49: 203-22.

138. Socransky S, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. **Periodontol** **2000**. 2005; 38: 135–187.

139. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RI Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**. 1998; 25: 134-44.

140. Stefani FA, Viana MB, Dupim AC, Brito JA, Gomez RS, da Costa JE, Moreira PR. Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues. **Immunobiology**. 2013; 218 (7): 1012-7.

141. Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. **Expert Rev Mol Med**. 2002; 4(4): 1-17.

142. Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S. DNA methyltransferases: A novel target for prevention and therapy. **Front Oncol**. 2014; 4:80.

143. Suter CM, Martin DI, Ward RI. Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. **Int J Colorectal Dis**. 2004; 19(2): 95-101.

144. Tadokoro Y, Ema H, Okano M, Li E, Nakauchi H. De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells. **J. Exp. Med**. 2007; 204:715–722 10.

145. Takiguchi M, Achanzar WE, Qu W, Li G, Waalkes MP. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. **Exp Cell Res**. 2003; 286: 355-65.

146. Talens RP, Boomsma DI, Tobi EW, Kremer D, Jukema JW, Willemsen G, Putter H, Slagboom PE, Heijmans BT. Variation, patterns, and temporal stability of DNA methylation: considerations for epigenetic epidemiology. **FASEB J.** 2010; 24 3135–3144.
147. Tao L, Yang S, Xie M, Kramer PM, Pereira MA. Effect of trichloroethylene and its metabolites, dichloroacetic acid and trichloroacetic acid, on the methylation and expression of c-Jun and c-Myc protooncogenes in mouse liver: prevention by methionine. **Toxicol Sci.** 2000; 54 (2):399-407.
148. Tervonen T, Raunio T, Knuutila M, Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. **J Clin Periodontol.** 2007 Maio; 34(5):377-83.
149. Uehara O, Abiko Y, Saitoh M, Miyakawa H, Nakazawa F. Lipopolysaccharide extracted from *Porphyromonas gingivalis* induces DNA hypermethylation of runt-related transcription factor 2 in human periodontal fibroblasts. **J Microbiol Immunol Infect.** 2014 Jun; 47(3):176
150. Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. **Cancer Res** 2007; 67(3): 946-50.
151. Veurink M, Koster M, Berg LT. The history of DES, lessons to be learned. **Pharm World Sci.** 2005; 27(3): 139-143.
152. Viana MB, Cardoso FP, Diniz MG, Costa FO, Da Costa JE, Gomez RS, Moreira PR. Methylation pattern of IFN- γ and IL-10 genes in periodontal tissues. **Immunobiology.** 2011 Aug; 216(8):936-41.
153. Wade PA. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. **Bioessays.** 2001;23(12):1131-7.
154. Wen H, Schaller MA, Dou Y, Hogaboam CM, Kunkel SL. Dendritic cells at the interface of innate and acquired immunity: the role for epigenetic changes. **J Leukoc Biol.** 2008 Mar; 83(3):439-46.
155. Winders BR, Schwartz RH, Bruniquel DA distinct region of the murine INF- γ promoter is hypomethylated from early Tcell development through mature naive and Th1cell differentiation, but is hypermethylation in Th2 cells. . **J Immunol** 2004; 173(12): 7377-7384.

156. Wu H, Lippmann JE, Oza JP, Zeng M, Fives-Taylor P, Reich NO. Inactivation of DNA adenine methyltransferase alters virulence factors in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol Immunol**. 2006; 21: 238-244, 2006
157. Wu H, Sun YE. Epigenetic Regulation of Stem Cell Differentiation. **Pediatric Research**. 2006; 59(4): 21R-25R.
158. Xiao W. Advances in NF- κ B signaling transduction and transcription. *Cellular & Molecular Immunology*. 2004; 1:425–433.
159. Xu J, Wu HF, Ang ES, Yip K, Woloszyn M, Zheng MH, Tan RX. NF- κ B modulators in osteolytic bone diseases. **Cytokine Growth Factor Rev**. 2009; Feb; 20(1):7-17.
160. Yang J, Wei X, Wu Q, Xu Z, Gu D, Jin Y, Shen Y, Huang H, Fan H, Chen J. Clinical significance of the expression of DNA methyltransferase proteins in gastric cancer. **Mol Med Rep**. 2011 Nov-Dec; 4(6):1139-43.
161. Yin L, Chung WO. Epigenetic regulation of human β -defensin 2 and CC chemokine ligand 20 expression in gingival epithelial cells in response to oral bacteria. *Mucosal Immunol*. 2011;4(4):409-19.
162. Zeisel SH. Importance of methyl donors during reproduction. **Am J Clin Nutr**. 2009; 89(2): 673S-7S.
163. Zeng H, Shi Z, Kong X, Chen Y, Zhang H, Peng H, Luo H, Chen P. Involvement of B-cell CLL/lymphoma 2 promoter methylation in cigarette smoke extract-induced emphysema. **Exp Biol Med** 2016; 241 (8):808-16.
164. Zhang S, Barros SP, Niculescu MD, Moretti AJ, Preisser JS, Offenbacher S. Alteration of PTGS2 promoter methylation in chronic periodontitis. **J Dent Res**. Feb 2010; 89(2):133-7.
165. Zhang S, Crivello A, Offenbacher S, Moretti A, Paquette DW, Barros SP. Interferon-gamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**. 2010a Nov; 37(11): 953-61.
166. Zheng J, Hou T, Gao L, Wu C, Wang P, Wen Y, Guo X. Association between CD14 gene polymorphism and periodontitis: a meta-analysis. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**. 2013; 23(2):115-233
167. Zijno A, Andreoli C, Leopardi P, Marcon F, Rossi S, Caiola S, Verdina A, Galati R, Cafolla A, Crebelli R. Folate status, metabolic genotype, and

biomarkers of genotoxicity in healthy subjects. **Carcinogenesis**. 2003; 24(6):1097-103.

8. ANEXOS

Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0075.0.203.000-11

Interessado(a): Prof. José Eustáquio da Costa
Departamento C.P.C.O
Faculdade de Odontologia- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 20 de abril de 2011, o projeto de pesquisa intitulado "**Análise da Metilação no promotor dos Genes CD14, TLR2 e TLR4 em pacientes com periodontite crônica**" e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG – FR-405548**Processo COEP:075/11****Título:** Análise da metilação no promotor dos genes CD14, TLR2 e TLR4 em pacientes com periodontite crônica**Área de conhecimento:** Ciências da Saúde – Odontologia**Pesquisador responsável:** Prof. José eustáquio da Costa**Instituição responsável pelo projeto:** Faculdade de Odontologia/UFMG**Data de entrega no COEP:** 14/03/2011**Recebido pelo parecerista:** 06/04/2010**Datas previstas para início do Projeto:** após aprovação pelo COEP
Término: Março/2012**Documentos Enviados:** FR CONEP; Protocolo de Pesquisa; Parecer consubstanciado da Câmara Departamental; Termo de compromisso com as devidas assinaturas; TCLE; Currículo (plataforma Lattes) dos pesquisadores; carta de anuência do Laboratório de Biologia das Interações Celulares do ICB/UFMG.**Sumário do Projeto:****Objetivo:** Avaliação do padrão de metilação do DNA em genes de receptores CD14, TLR2 e TLR4 em pacientes com periodontite crônica e periodontite agressiva.**Metodologia:** Serão formados dois grupos (caso e controle). No grupo caso serão incluídos pacientes adultos, de ambos os gêneros, com doença periodontal atendidos nas Clínicas de Periodontia da FO/UFMG. O grupo controle será composto por pacientes adultos sem nenhuma doença periodontal, que são atendidos em outras clínicas da FO-UFMG. Os pacientes serão submetidos a anamnese, exame físico e retirada de fragmentos de tecido gengival obtidos de tecidos retirados durante cirurgia recomendada no tratamento da doença periodontal (G. Caso) e de cirurgia periodontal estética ou exodontia de dentes hígidos (G. Controle). Os critérios de inclusão e exclusão estão bem estabelecidos. A pesquisa não adiciona procedimento ao tratamento habitual. O TCLE contém as informações necessárias, em linguagem acessível.**Mérito:** O projeto é relevante, considerando a grande frequência de doença periodontal e os resultados do estudo poderão contribuir para melhor compreensão da patogênese da doença e o desenvolvimento de medidas de tratamento e prevenção da doença periodontal.**Voto:** Diante do exposto, s.m.j., sou pela aprovação do projeto.

Belo Horizonte, 10 de abril de 2011.

9. APÊNDICES

Apêndice 1: Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de Consentimento Livre e esclarecido

Você esta sendo convidado a participar do projeto de pesquisa "Avaliação do padrão de metilação dos genes *CD14* e *NFkB* e expressão das DNAs metiltransferases na Periodontite Crônica". Essa pesquisa será realizada por mim Simone Angélica de Faria Amormino Carvalho, doutorando em Biologia Celular pela UFMG, e orientada pela professora Paula Rocha Moreira. A doença periodontal é uma doença que acomete os dentes, gengiva e osso, gerando uma inflamação da gengiva, sangramento e perda progressiva do osso ao redor dos dentes e que pode variar de uma pessoa para outra. No entanto, pouco se conhece sobre a influência de alterações genéticas, no desenvolvimento da doença. Para a realização dessa pesquisa, é necessário realizar a remoção de um pequeno pedaço da gengiva que é realizada durante a cirurgia que lhe foi indicada não representa qualquer risco, incômodo ou prejuízo para o seu tratamento, pois faz parte do procedimento. Todas as informações coletadas terão finalidade exclusivamente científica e serão mantidas em sigilo. Em hipótese alguma o seu nome será divulgado. A sua participação é voluntária. Você poderá desistir de participar e cancelar o seu consentimento em qualquer momento da pesquisa. A desistência ou a não aceitação em fazer parte dessa pesquisa não irá interferir no seu tratamento na Clínica de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor as causas da doença periodontal e isso será muito importante para que possamos prevenir o seu desenvolvimento e melhorar o tratamento da doença que tanto leva a perdas dentárias.

Termo de consentimento

Eu, _____, RG: _____, aceito participar deste estudo de forma voluntária e afirmo que devidamente esclarecido quanto aos objetivos da pesquisa, quanto à preservação da minha imagem e quanto ao destino dos dados coletados. Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo as coletas e a utilização das amostras neste projeto de pesquisa. Sei que posso desistir a qualquer momento sem que isso acarrete qualquer tipo de prejuízo para meu tratamento na Clínica de Odontologia da UFMG. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura

Pesquisadores responsáveis:

Simone Angélica de Faria Amormino (31) 9283-7602

Paula Rocha Moreira

FO-UFMG Av. Antônio Carlos, 6627.Pampulha-Telefone: (31) 3409-2412

COEP: Comitê de Ética na Pesquisa Av. Antônio Carlos, 6.627. Unidade

Administrativa II, 2º andar Telefone: (31) 3409-4592.

Apêndice 2: Ficha Clínica

PESQUISA PARA TESE DE DOUTORADO FICHA CLÍNICA

DADOS PESSOAIS DO PACIENTE

Nome:		Sexo:	Estado Civil:	
Data de Nascimento: ___/___/___		Naturalidade:	Nacionalidade:	
Profissão:		RG:	CPF:	
Endereço:				
Bairro:	CEP:	Cidade:	UF:	Tel:
Renda Familiar:				
ANAMNESE				

1. Queixa principal: _____		
2. Início e evolução da doença: _____		
3. Quando fez o último tratamento periodontal? _____		
4. Esta sob tratamento médico? _____		
5. Faz uso de algum medicamento? _____		
6. Fez uso de algum antibiótico e/ou antiinflamatório nos últimos seis meses? _____		
7. Tem algum tipo de alergia? _____		
8. Apresenta algumas das seguintes condições:		
() Alteração de pressão arterial	() Doença / alteração respiratória	
() Alteração cardíaca	() Doença / alteração gastro-intestinal	
() Hemorragias ou doenças no sangue	() Doença nos rins	
() História de febre reumática	() Diabetes ou doenças endócrinas	
() Gravidez ou lactante	() Alguma DST	
9. Alguém na família apresenta alguma dessas alterações? _____		
10. Tabagismo	a. Fumante: Tempo: _____ Quantidade: _____	
	b. Ex-fumante: Abandonou o hábito há quanto tempo: _____	
	c. Não fumante	

Declaro que todas as informações deste prontuário, por mim prestadas, são verdadeiras

Belo Horizonte _____ de _____ de 20 _____

Assinatura do paciente ou responsável

Exame Radiográfico

Data: __/__/__

Periodontograma

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
PS	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]
NIC	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Sangramento	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Mobilidade	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Furca	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]

	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
PS	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]
NIC	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Sangramento	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Mobilidade	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Furca	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]	[]

Data exame: __/__/__

Data coleta: __/__/__

Observações

Diagnóstico:

Tecido () Dente _____ Região D() V() M() L/P()

Pesquisadora: Simone Angélica de Faria Amormino
Orientadora: Pra.Dra. Paula Rocha Moreira