

Paula Rocha Moreira

Evidências da epigenética na doença periodontal

Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2010

Paula Rocha Moreira

Evidências da epigenética na doença periodontal

Monografia apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de especialista em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. José Eustáquio da Costa

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Odontologia

Belo Horizonte
2010

Agradecimentos

Ao **Prof. José Eustáquio** por fazer parte da minha formação desde o mestrado e por proporcionar mais esta conquista em minha formação. Agradeço por sua imensa disponibilidade em ajudar, pelo incentivo constante para que eu me tornasse uma periodontista, pela confiança e pela amizade;

Aos professores e colegas do curso de Especialização;

Aos pacientes pela disponibilidade;

À minha família, por me acompanhar e pelo incentivo.

“... não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas.
O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos
ou desistem deles. “

Augusto Cury

Resumo

A doença periodontal é uma doença multifatorial caracterizada por inflamação e destruição dos tecidos de suporte dos dentes como o resultado da resposta de um hospedeiro susceptível ao desafio bacteriano. Estudos tem demonstrado que eventos epigenéticos são capazes de influenciar a produção de citocinas, contribuindo para o desenvolvimento de doenças com perfil inflamatório. Eventos epigenéticos atuam através do remodelamento da cromatina e podem seletivamente ativar ou inativar os genes, influenciando a sua expressão fenotípica. O processo epigenético pode influenciar a patogênese e determinar a forma clínica de doenças infecciosas pela alteração no perfil de citocinas produzido. Estes achados podem ter relevância para as doenças inflamatórias nas quais a expressão de citocinas está alterada. A proposta desta revisão é mostrar evidências que suportam a hipótese que as alterações epigenéticas, tais como hiper ou hipometilação do DNA, em genes relacionados com o sistema imune, podem ajudar a compreender os mecanismos relacionados à atividade da doença periodontal. O estudo da epigenética na doença periodontal pode ter um impacto no diagnóstico e tratamento da doença periodontal no futuro.

Palavras-chaves: epigenética, metilação, periodontite, inflamação, citocinas.

Abstract

Periodontitis is a multifactorial infection characterized by inflammation and destruction of tooth supporting tissues, as a result of the response of a susceptible host to bacterial challenge. Studies have demonstrated that epigenetic events are able to influence the production of cytokines, contributing to the development of inflammatory diseases. Epigenetic events act through the remodeling of chromatin and can selectively activate or inactivate genes, determining their expression. The epigenetic process, by inducing a change in cytokine profile, may subsequently influence the pathogenesis and determine the outcome of many infectious diseases. These findings may have relevance for inflammatory diseases in which the expression of cytokines is unregulated. The purpose of this review is to show evidence that support the hypothesis that epigenetic alterations, such as hyper and hypomethylation, mainly of cytokine genes, could help to understand the mechanisms related to periodontal disease activity. Therefore, epigenetics may have future impact on diagnosis and/or therapeutics of periodontal disease.

Keywords: epigenetic, methylation, periodontitis, inflammation, cytokines.

Lista de figuras

Figura 1- Esquema do processo de formação da 5-Metilcitosina (5-MeC) pela DNA metiltransferase 16

Figura 2-A influência da metilação do DNA na expressão gênica. 17

Lista de abreviaturas

5-MeC- 5 metil citosina

C-citosina

CD14-cluster of differentiation 14

CD80- cluster of differentiation 80

CD86- cluster of differentiation 86

Cox- ciclooxigenase

CpG- citosina-fosfato-guanina

DNA-ácido desoxirribonucléico

DNMT- DNA metiltransferase

G-guanina

HDAC- desacetilases de histonas

IFN- γ -interferon gama

IL-interleucina

LBP- "LPS binding proteína"

LPS-lipopolissacarídeo

PA-periodontite agressiva

PC-periodontite crônica

RNA-ácido ribonucléico

sCD14-receptor CD14 na forma solúvel

TGF- β - "transforming growth factor beta" fator de crescimento transformante beta

Th- linfócito T helper

TLR-receptor do tipo Toll

TNF- α - "tumor necrosis factor alpha" fator de necrose tumoral alfa

Sumário

1- Introdução	10
2- Revisão de literatura	11
2.1- Considerações gerais sobre a doença periodontal e a sua patogênese	11
2.2- Mecanismos epigenéticos	15
2.3- Metilação em genes envolvidos com a resposta imune	18
2.4- Evidências da metilação na doença periodontal	19
3- Discussão	22
4- Conclusões	23
5- Referências	24

1- Introdução

A doença periodontal apresenta etiologia primária bacteriana e com vários fatores de risco associados, caracterizando-a como uma doença multifatorial. Nos últimos anos, os fatores relacionados ao hospedeiro têm sido alvo de investigação, devido à variabilidade da resposta imune frente a presença bacteriana. Os primeiros indícios da importância da susceptibilidade do hospedeiro na patogênese da doença surgiram dos estudos em gêmeos monozigóticos e dizigóticos. A partir destes estudos tornou-se claro que a carga genética do indivíduo era fundamental na forma como o indivíduo interagia com o ambiente.

Na última década, o estudo de polimorfismos genéticos proporcionou a avaliação da influência do código genético na resposta imune. Associações entre os polimorfismos funcionais nos genes das citocinas, principalmente interleucina 1 beta e alfa, e indivíduos com a periodontite crônica provocaram um avanço na compreensão da patogênese da doença.

Atualmente, sabe-se que a informação genética só pode ser traduzida com exatidão se a sequência de nucleotídeos estiver correta e se a conformação da cromatina permitir o acesso dos fatores de transcrição. Esta alteração conformacional do DNA é ocasionada por eventos epigenéticos que atuam através de modificações químicas no DNA, remodelando a cromatina e seletivamente ativando ou inativando os genes (ADCOCK *et al.*, 2007). Dados que a presença de metilação do DNA, um evento epigenético, está relacionada com o desenvolvimento de doenças com um perfil inflamatório despertou o interesse de pesquisadores em investigar estes eventos na doença periodontal.

O objetivo esta revisão é buscar embasamento na literatura que suporte a hipótese da influência epigenética na doença periodontal, assim como os dados de estudos recentes que iniciaram esta investigação.

2- Revisão de literatura

2.1- Considerações gerais sobre a doença periodontal e a sua patogênese

A doença periodontal é uma reação inflamatória destrutiva caracterizada por inflamação e subsequente perda de tecido de suporte dentário. É a doença óssea mais prevalente em humanos e importante causa de perda dental em adultos (AAP 1999, PAGE 1997). Com o decréscimo da prevalência de cárie no mundo ocidental, a doença periodontal assume, em muitos países, um lugar de destaque em saúde pública.

Infecção e inflamação constituem marcos fundamentais da doença periodontal. A reação inflamatória é visível, microscópica e clinicamente, no periodonto afetado, e representa a resposta de um hospedeiro susceptível à presença da microbiota da placa e seus produtos (SCHENKEIN, 2006). A etiologia primária da doença periodontal consiste de bactérias específicas, predominantemente anaeróbias Gram-negativas (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994), que formam um biofilme bacteriano possibilitando a permanência dos patógenos nas superfícies dos dentes e no ambiente da bolsa periodontal, determinando uma inflamação persistente (MARTINS, 1997).

Os estágios iniciais da doença periodontal representam uma evolução inflamatória acompanhada de modificações no tecido conjuntivo e epitélio juncional (PAGE e SHROEDER, 1976). A lesão inicial é caracterizada pela presença de um infiltrado celular composto principalmente por macrófagos e linfócitos T (PAGE e SHROEDER, 1976). A lesão avançada ocorre quando a inflamação se alcança para o ligamento periodontal e osso alveolar, verificando-se uma contínua perda de fibras colágenas subgingivais próxima à bolsa periodontal, presença de reabsorção óssea e um aumento de linfócitos B e plasmócitos (PAGE e SHROEDER, 1976).

A doença periodontal, em suas várias manifestações, é classificada em dois grandes grupos, de acordo com o “International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions”: a periodontite crônica (PC) e a periodontite agressiva (PA) (ARMITAGE, 1999). A periodontite crônica (PC) é a forma mais comum de periodontite acometendo geralmente adultos,

podendo também ocorrer em crianças. Caracteriza-se pela presença de grande quantidade de irritantes locais que são compatíveis com o grau de destruição observado e, em geral, apresenta progressão lenta à moderada; porém períodos de destruição mais rápidos podem ser observados (ARMITAGE, 1999). A periodontite agressiva (PA) geralmente acomete indivíduos jovens, é caracterizada pela rápida progressão da doença, pela ausência de acúmulos de irritantes locais que sejam compatíveis com o grau de destruição observado e por uma história familiar da doença (ARMITAGE, 1999). O enfoque atual para a compreensão da patogenia dessas periodontites implica em considerá-las infecções com uma microflora altamente virulenta e/ou um alto nível de susceptibilidade do hospedeiro.

Vários microorganismos, predominantemente Gram-negativos, foram implicados na etiologia da doença periodontal. A predominância de bactérias Gram-negativas dentro das bolsas periodontais implica em altas concentrações locais de fatores de virulência, permitindo aos patógenos a sua interação e sobrevivência dentro do hospedeiro (CUTLER *et al.*, 1995; MADIANOS *et al.*, 2005). São características desses fatores: auxiliar o microorganismo a colonizar a placa dental e/ou o sulco gengival; permitir que o microorganismo não sofra a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, destruindo os leucócitos polimorfonucleares; inibir a quimiotaxia dos leucócitos para os locais da infecção; e causar a destruição tecidual, estimulando a reabsorção óssea e degradando o tecido conjuntivo (MADIANOS *et al.*, 2005).

O lipopolissacarídeo (LPS), presente na cápsula polissacarídea, é um fator de virulência abundante na superfície de bactérias Gram-negativas e apresenta papel crucial na patogênese da doença periodontal. O LPS apresenta habilidade de induzir uma ampla resposta pró-inflamatória, estimulando a produção de citocinas, tais como interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interferon gama (IFN γ) (MADIANOS *et al.*, 2005). A indução das reações inflamatórias pela presença do LPS de bactérias periodontopáticas ocorre via receptor CD14 (WANG *et al.*, 2003).

O receptor CD14 é constitutivamente expresso, principalmente em monócitos e macrófagos,

e medeia a ativação celular induzida por LPS, promovendo a ativação dos receptores do tipo Toll (TLR) (SUGAWARA *et al.*, 1998; PAGE *et al.*, 1997; MADIANOS *et al.*, 2005). A sua forma solúvel (sCD14) é abundante no soro e, aparentemente, derivada da secreção e clivagem enzimática da âncora de glicosilfosfatilinositol do CD14 expresso na superfície celular (BALDINI *et al.*, 1999). O LPS liga-se à proteína LBP (LPS-binding protein) e este complexo é reconhecido pelo receptor CD14 (PAGE E KORNMAN, 1997). Em seguida, a ativação de TLRs leva à indução da atividade antimicrobiana e a produção de citocinas inflamatórias, eventos centrais na defesa inata (LANCASTER *et al.*, 2005). TLR controla a produção da imunidade adaptativa através da indução de moléculas apresentadoras de antígeno (HLA-DR), moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86) e citocinas, que fornecem sinais secundários críticos para o início e desenvolvimento da imunidade adaptativa (TAKEDA *et al.*, 2003). No processo de ativação celular, o aumento da intensidade de expressão de HLA-DR é um indicativo de ativação dos monócitos (RAZMA *et al.*, 1984). A indução das moléculas coestimulatórias, CD80 e CD86, permite que as mesmas se associem ao seu ligante CD28, estimulando a proliferação linfocitária e produção de citocinas (HARDING *et al.*, 1992). Além de interagir com CD28, essas moléculas também reconhecem o CTLA-4, sendo que essa interação diminui respostas celulares, num mecanismo inverso ao da interação com CD28 (WALUNAS *et al.*, 1994; HATHCOCK *et al.*, 1994). Por sua natureza modulatória, sugere-se que essa interação seja importante nos processos de cronificação de doenças inflamatórias (SOUZA *et al.*, 2007). Desta forma, a interação do LPS com as células do hospedeiro gera a transdução de sinais que causam o aumento da expressão de moléculas essenciais na ativação do processo inflamatório (HAYASTTI *et al.*, 1999).

Embora as bactérias apresentem um papel claro na patogênese da periodontite, está bem definido que o sistema imune do hospedeiro é essencial no processo da doença. As células do sistema imune estão amplamente distribuídas pelo organismo e, na presença de um processo infeccioso, há a necessidade de concentrar estas células e seus produtos no local da infecção (ALLISSON e LANIER, 1987). A atividade inflamatória observada na doença periodontal é um

processo decorrente da migração e recrutamento celular e o estabelecimento dessa atividade envolve o deslocamento inicial e adesão dos leucócitos ao endotélio vascular, assim como sua posterior emigração para o tecido, processos que compreendem várias etapas e envolvem diversas proteínas de adesão e quimiotáticas (PALMA-CARLOS & PALMA-CARLOS, 1993, TEDDER *et al.*, 1995). Após atravessarem as paredes dos vasos, respondendo aos estímulos quimiotáticos, os leucócitos dirigem-se ao sítio inflamatório no qual realizarão suas funções efetoras.

GEMMELL *et al.* (1996) sugeriram que um desequilíbrio imunoregulatório de células T locais pode existir na doença periodontal, possivelmente relacionado à produção de citocinas distintas. Estas moléculas, sendo produzidas por células no microambiente inflamatório, irão, pelo controle das funções de diversos tipos celulares e da migração/recrutamento celular, determinar o destino do processo inflamatório. Enquanto citocinas como IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-6 e IL-8 promovem direta ou indiretamente a atividade inflamatória, IL-4, IL-10 e IL-13 têm sido relacionadas à atividade anti-inflamatória. Na verdade, o equilíbrio entre estas citocinas e, conseqüentemente, o equilíbrio entre a representatividade das atividades coordenadas por elas, pode definir estágios diferentes da inflamação.

Linfócitos Th1 e Th2 foram identificados como sendo sub-populações funcionalmente distintas de células T CD4+, sendo que sua distinção funcional é resultado de uma produção diferenciada de citocinas (MOSSMAN *et al.*, 1986). Células Th1 são caracterizadas pela produção de interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2), estão associadas com a inflamação e induzem resposta imune mediada por células. Células Th2 produzem IL-4, IL-5, e IL-13, auxiliam a proliferação e diferenciação dos linfócitos B e estão associadas com resposta humoral. Em humanos, tanto as células Th1 quanto Th2 podem secretar a citocina IL-10, uma importante citocina imuno-modulatória (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1992). Durante a resposta imune, um perfil de citocinas Th1 ou Th2 pode dominar indicando uma polarização da resposta.

Resultados têm freqüentemente demonstrado uma mistura de citocinas derivadas de células Th1 e Th2 ou uma predominância de um dos tipos de resposta em indivíduos com doença

periodontal (SEYMOUR e GEMMELL, 2001), A ocorrência da mistura de citocinas Th1 e Th2 pode ser explicada tendo em vista o grande número de espécies bacterianas que podem interagir com o sistema imune na doença periodontal (SCHENKEIN, 2006). Outros resultados favorecem a hipótese que as lesões da periodontite crônica são mais associadas com uma resposta Th2, enquanto a resposta imune em indivíduos com periodontite agressiva localizada parece estar polarizada em direção à uma resposta Th1 (SCHENKEIN, 2006; TANAKA *et al.*, 2003). Entretanto tem sido sugerido que mecanismos imunoregulatórios particulares estão envolvidos com o estabelecimento de cada forma clínica (LIMA, tese de Doutorado, 2003).

Há crescentes evidências que sugerem que outros fatores do hospedeiro, tais como diabetes, fumo e fatores genéticos contribuam para o estabelecimento de diferentes formas clínicas, distribuição das lesões e gravidade da destruição tecidual (McDEVITT *et al.*, 2000). Dados adicionais da contribuição genética para a periodontite emergiram recentemente da investigação de polimorfismos genéticos que se correlacionam com fenótipos da resposta imune encontrados em grupos de pacientes periodontais (KORNMAN *et al.*, 1997; LOOS *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2005, 2007a, 2007b). Estes estudos apontam para a possibilidade de que a predisposição genética possa definir a evolução da doença periodontal.

Apesar de vários estudos investigarem as alterações moleculares envolvidas na patogênese da doença periodontal, outros fatores relacionados à regulação gênica podem interferir na predisposição ao aparecimento dos sinais e sintomas da doença. Neste enfoque, mecanismos epigenéticos envolvendo modificadores no DNA / histonas e seu impacto na regulação do gene tem despertado o interesse dos pesquisadores (GOPISETT *et al.*, 2006).

2.2- Mecanismos epigenéticos

Os mecanismos epigenéticos referem-se a mudanças na expressão dos genes que não são resultantes de alterações na seqüência de nucleotídeos (NARLIKAR *et al.*, 2002). Os eventos

epigenéticos atuam através de modificações químicas no DNA, remodelando a cromatina e seletivamente ativando ou inativando os genes (ADCOCK *et al.*, 2007). Os estágios de condensação da cromatina são controlados por padrões epigenéticos reversíveis de metilação do DNA e de modificação das histonas (FEINBERG e TYCKO, 2004).

A metilação do DNA e a desacetilação de histonas são os principais mecanismos epigenéticos observados nas células humanas (SHAW, 2006). A metilação do DNA é caracterizada pela adição de um grupo metil no carbono 5` do anel de citosina, resultando em 5-metilcitosina (Figura 1). A desacetilação de histonas é caracterizada pela remoção do grupo acetil das histonas promovendo alteração de carga e empacotamento do DNA em torno das histonas (SANDERS, 2006). Ambos os mecanismos impedem a ligação dos fatores de transcrição na região promotora dos genes. Contudo, as modificações de histonas são consideradas eventos mais transitórios, enquanto a metilação do DNA fornece uma forma estável de regulação gênica (BÄCKDAHL *et al.*, 2009).

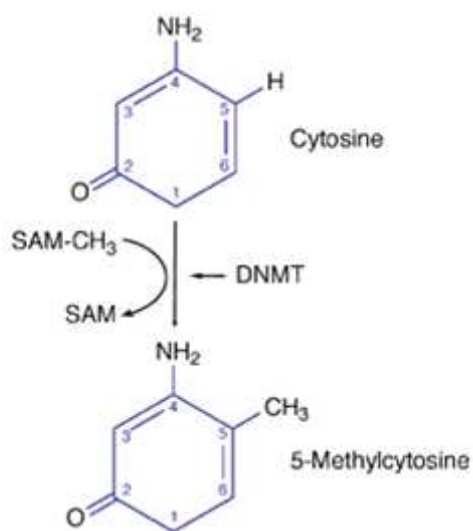


Figura 1 - Esquema do processo de formação da 5-Metilcitosina (5-MeC) pela DNA metil transferase. Fonte: Strathdee & Brown, 2002. In: OLIVEIRA, 2009.

A metilação do DNA é realizada por DNA metiltransferases (DNMT) (BAYLIN, 2005). DNMTs adicionam o grupo metil em citosinas presentes em regiões ricas em citosina e guanina,

conhecidas como ilhas CpG, encontradas nas regiões promotoras dos genes (JOHNSON e BELSHAW, 2008). A presença do grupo metil impede a interação dos fatores de transcrição no promotor do gene, inibindo efetivamente a transcrição (BAYLIN, 2005). Aproximadamente 50% dos genes humanos contém ilhas CpG e a maioria não está metilada nos tecidos normais (JOHNSON e BELSHAW, 2008).

Ilhas CpG não metiladas são relacionadas com uma estrutura transcricionalmente ativa, enquanto ilhas metiladas recrutam proteínas de ligação ao grupo metil que interagem com desacetilases de histonas (HDACs). Consequentemente ocorre a remoção do grupo acetil promovendo a compactação da cromatina e impedindo a ligação dos fatores de transcrição (NG e BIRD, 1999; JONES *et al.*, 1998; NAN *et al.*, 1998) (Figura 2). Os produtos dos genes não são expressos e muitas funções celulares podem ser alteradas pela metilação do DNA, como a regulação da proliferação celular e o processo inflamatório (ADCOCK *et al.*, 2007).

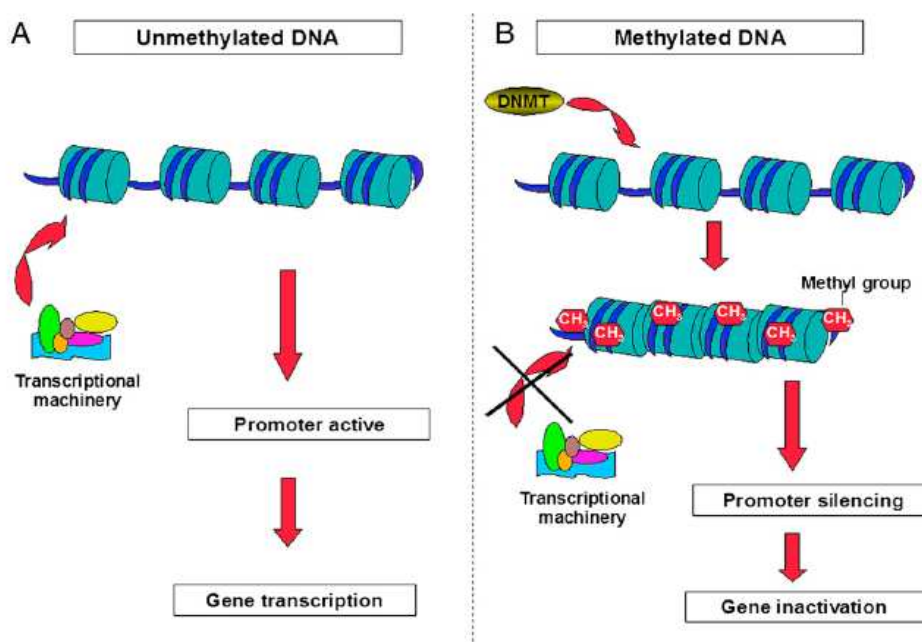


Figura 2- A influência da metilação do DNA na expressão gênica. Fonte: CARDOSO *et al.*, 2010.

Estudos sugerem que o silêncio transcricional induzido pela metilação é tão importante quanto a mutação genética ou perda da heterozigose na progressão do câncer (HA e CALIFANO, 2006). A incidência das alterações epigenéticas varia de acordo com o gene envolvido e o tipo de lesão (revisto por RODENHISER e MANN, 2006). Portanto, a identificação de genes susceptíveis à metilação pode fornecer dados importantes sobre o desenvolvimento das doenças humanas.

A identificação de metilação no DNA em diversos tumores tem sido alvo de estudos, principalmente envolvendo os genes relacionados ao ciclo celular (MOREIRA et al., 2009a; MOREIRA et al., 2009b). Embora alterações epigenéticas, tais como a metilação do DNA e a acetilação de histonas, sejam consideradas importantes na carcinogênese humana (KISHI *et al.*, 2005), estes eventos não foram ainda bem estabelecidos em doenças inflamatórias. A presença dessas modificações epigenéticas pode resultar em mudanças na via crucial que mantém a homeostase celular (HA e CALIFANO, 2006).

2.3- Metilação em genes envolvidos com a resposta imune

Genes codificadores de citocinas são alvos de múltiplos eventos epigenéticos, como a metilação e a demetilação (FITZPATRICK e WILSON, 2003). Estudos têm demonstrado que a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ em Th1 e Th2 é dependente de vias epigenéticas de ativação e silenciamento (SANDERS, 2006; SANCHEZ-PERNAUTE *et al.*, 2008). Durante este processo, a ativação do gene *IFN- γ* e o silenciamento do gene *IL-4*, e vice-versa, são regulados pela metilação do DNA (SANDERS, 2006).

Investigações sobre a presença de alterações no padrão de metilação nos genes codificadores de IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-6, TNF- α tem sido realizadas. Agentes inibidores da metilação do DNA induzem ao aumento da expressão de IL-2 (FITZPATRICK e WILSON, 2003). A expressão de IFN- γ e IL-6 é regulada pelo padrão de metilação da região promotora dos seus respectivos genes (ARMENANTE *et al.*, 1999; WHITE *et al.*, 2002) e recentes evidências sugerem que alterações na

metilação de *IL-10* ocorrem em células T regulatórias (ADCOCK *et al.*, 2007). Adicionalmente, tem sido demonstrado que modificações epigenéticas no gene *TNFA* ocorrem em resposta à estimulação aguda (SULLIVAN *et al.*, 2007). Achados sobre a repressão de genes pró-inflamatórios via mecanismos epigenéticos são descritos durante a inflamação sistêmica grave (GAZZAR *et al.*, 2007). Estes dados sugerem que o padrão de metilação de genes codificadores de citocinas pode interferir na habilidade da célula em produzir citocinas durante o processo inflamatório.

Embora mais escassos, alguns estudos epigenéticos foram realizados considerando os receptores envolvidos na resposta ao estímulo bacteriano, como os TLR. A repressão dos genes *TLR2* e *TLR4* foram associadas à ocorrência de metilação no DNA (FUTURA *et al.*, 2008, ZAMPETAKI *et al.*, 2006). A hipometilação de *TLR2* foi associada ao aumento da resposta inflamatória frente ao estímulo bacteriano nas células epiteliais brônquicas na fibrose cística (SHUTO *et al.*, 2006). Os autores sugerem que a hipometilação de *TLR2* induz a hiperacetilação das histonas e promove a liberação de repressores transcricionais como MeCP2.

Alterações epigenéticas apresentam um papel importante nos processos inflamatórios e estudos envolvendo genes de citocinas e receptores têm sido realizados em diversas doenças, como na artrite reumatóide, na inflamação das vias aéreas, na tolerância à endotoxinas e outros (GAZZAR *et al.*, 2007; FU *et al.*, 2007; ADCOCK *et al.*, 2007). Alterações na expressão destas moléculas podem influenciar a patogênese das doenças com um perfil inflamatório (SANDERS, 2006; REINER, 2005). Baseado nestes achados, o uso de agentes demetilantes, de DNMT e de inibidores de HDAC tem sido sugeridos como ferramentas terapêuticas na inflamação crônica (BÄCKDAHL *et al.*, 2009; FUKS *et al.*, 2000).

2.4- Evidências da metilação na doença periodontal

Evidências têm sugerido que os eventos epigenéticos podem ser importantes na compreensão da variabilidade interindividual na resposta inflamatória (WILSON, 2008). Uma vez

que os indivíduos não são igualmente susceptíveis aos efeitos destrutivos das infecções bacterianas, está claro que a variabilidade na resposta do hospedeiro entre os indivíduos pode contribuir significativamente para a expressão das doenças bucais na população (VAN DYKE e SHEILESH, 2005). Essa variabilidade da resposta é observada na doença periodontal e a ocorrência de hipo ou hipermetilação em genes codificadores de citocinas e/ ou receptores pode interferir no estabelecimento e gravidade da doença periodontal.

Inflamação crônica e diferentes agentes infecciosos são alguns dos fatores que podem modificar o epigenoma (JOHNSON e BELSHAW, 2008; VAISSIERE *et al.*, 2008; STENVINKEL *et al.*, 2007; BOBETISIS *et al.*, 2007). O potencial para a bactéria alterar o padrão de metilação do DNA na mucosa bucal está sob investigação (BOBETISIS *et al.*, 2007). Contudo, não está definido se os mecanismos epigenéticos ocorrem devido à interação bacteriana com o tecido ou como uma consequência da resposta inflamatória do hospedeiro (BOBETISIS *et al.*, 2007). As presenças constantes de inflamação e de bactérias na doença periodontal suportam a hipótese de alteração do epigenoma na doença periodontal.

O interesse dos pesquisadores sobre a possível influência epigenética na doença periodontal surgiu recentemente (OFFENBACHER *et al.*, 2008). A presença de fatores de risco comuns tanto à doença periodontal quanto à ocorrência de metilação é citado como a principal justificativa para o estudo deste evento epigenético na patogênese da doença (OFFENBACHER *et al.*, 2008). Além da presença constante de inflamação e de bactérias, o tabagismo, diabetes, idade e outros fatores têm sido relacionados à alteração no padrão de metilação normal da célula.

Em relação à idade, foi demonstrado que a metilação do gene *COL1A1* ocorre no ligamento periodontal durante o envelhecimento (OHI *et al.*, 2006). A presença da metilação neste gene pode ocasionar a diminuição de colágeno 1 α no ligamento periodontal, interferindo no desenvolvimento da doença. Segundo SANCHEZ-PERNAUTE *et al.* (2008), o aumento do silenciamento dos genes com a idade pode contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas.

Atualmente, o foco dos trabalhos tem sido em relação aos genes de citocinas, importantes

moléculas na patogênese da periodontite. Dados preliminares sugerem uma hipometilação do gene *IL-6* nos tecidos de indivíduos com doença periodontal, sugerindo uma expressão exagerada desta citocina (OFFENBACHER *et al.*, 2008). Contudo, recentemente, não foi observada associação entre a alteração no perfil de metilação no gene da *IL-6* nos tecidos periodontais de indivíduos com periodontite crônica e o controle (STEFANI *et al.*, 2010 – em preparação).

O gene da *IL-8* também está sob investigação. A hipometilação da região promotora do gene *IL-8* foi verificada em células da mucosa oral de indivíduos com periodontite crônica (OLIVEIRA *et al.*, 2009). A hipometilação foi correlacionada com o aumento da expressão de RNA mensageiro de *IL-8*. Interessantemente, não foi verificada alteração nos resultados decorrente da inclusão no estudo de tabagistas (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Em indivíduos com periodontite agressiva também foi observada um padrão de hipometilação no gene da *IL-8* quando comparado ao controle (ANDIA *et al.*, 2010).

Em relação aos genes que codificam *IFN- γ* e *IL-10* não foi observada alteração no padrão de metilação entre amostras de tecidos gengivais de indivíduos com periodontite crônica e controle. Neste trabalho foi verificada a presença de metilação em ambos os genes como um evento comum nos tecidos periodontais (VIANA *et al.*, 2010- em preparação).

Outros genes envolvidos com o processo inflamatório também tem sido alvo de investigação. O gene *PTGS2*, gene envolvido na via da prostaglandina E, apresentou hipermetilação nos tecidos periodontais de indivíduos com periodontite crônica. A presença de metilação na região promotora foi associada com uma menor expressão de *COX-2* nas amostras consideradas (ZHANG *et al.*, 2010).

A escassez de trabalhos sobre epigenética na doença periodontal deve-se ao fato de ser um assunto que despertou o interesse dos pesquisadores recentemente baseado nos dados obtidos nas doenças com um perfil inflamatório. O padrão de metilação em genes do sistema imune pode ter relevância nas doenças nas quais a expressão de alguns mediadores inflamatórios está alterada, como na doença periodontal. É possível que diante de um estímulo, o perfil da resposta inflamatória

possa ser alterado dependendo da metilação presente em genes envolvidos com a resposta imune.

3- Discussão

A investigação de eventos epigenéticos na doença periodontal está em seu início e ainda não permite classificar a ocorrência de hiper ou hipometilação como mecanismos importantes no desenvolvimento da doença. Baseado no exposto fica claro a importância das alterações epigenéticas na resposta imune elaborada nas doenças inflamatórias. Desta forma, estudos que permitam um conhecimento detalhado sobre a presença de metilação em genes de citocinas e receptores importantes na patogênese da doença periodontal parece promissor.

Os estudos sobre a metilação na doença periodontal devem ter um desenho experimental bem delineado para evitar a presença de fatores de confundimento. Os grupos de estudo devem ser pareados por gênero e idade, separados em relação ao hábito do tabagismo e qualquer outro fator que interfira na metilação do DNA. Outro fator importante é o local da coleta da amostra, que preferencialmente deve ser na região da bolsa periodontal pois o padrão de metilação não é o mesmo em todas as células do corpo. Todos estes fatores podem gerar resultados contraditórios entre os trabalhos.

Atualmente, o que se discute é se os mecanismos epigenéticos ocorrem devido à interação bacteriana com o tecido ou como uma consequência da resposta inflamatória do hospedeiro (BOBETSIS *et al.*, 2007). Sendo assim, os estudos sobre metilação também deveriam investigar sobre o efeito do estímulo de LPS no epigenoma, o perfil bacteriano dos indivíduos com alteração no padrão de metilação e o infiltrado inflamatório nos tecidos gengivais. Com este enfoque será possível compreender melhor estes eventos em genes do sistema imune e sua participação na patogênese da doença periodontal. Este avanço poderá estabelecer no futuro novas abordagens para

o diagnóstico, classificação e tratamento destas lesões.

4- Conclusões

- A presença de hiper ou hipometilação em genes relacionados com o sistema imune interferem na expressão fenotípica em doenças com um perfil inflamatório.
- Estudos adicionais são necessários para avaliar quais os mecanismos estão envolvidos na alteração do “status” da metilação nas doenças inflamatórias.
- Devido à escassez de dados sobre metilação na doença periodontal, ainda não é possível estabelecer uma relação deste evento epigenético com a patogênese da doença.
- O estudo sobre a influência epigenética na doença periodontal parece promissor e pode trazer avanços no tratamentos dos indivíduos acometidos pela doença.

5- Referências

- ADCOCK IA, TSAPROUNI L, BHAVSAR P, ITO K. Epigenetic regulation of airway inflammation. *Curr Opin Immunol* 19, 694-700, 2007.
- ALLISSON, J.P e LANIER, L.L. Structure, function, and sorology of the T cell antigen receptor complex. *Annu.Rev.Immunol.*, v.5 , p.503,1987.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. International Workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontol*, 4(1):7-37, 1999.
- ANDIA DC, DE OLIVEIRA NF, CASARIN RC, CASATI MZ, LINE SR, DE SOUZA AP. DNA methylation status of the IL-8 gene promoter in aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2010 May 3.
- ARMENANTE F, MEROLA M, FURIA A, PALMIERI M. Repression of the IL-6 gene is associated with hypermethylation. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 644-647, 1999.
- ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann.Periodontol.*, v.4, n.1, p.1-6, 1999.
- BÄCKDAHL L, BUSHELL A, BECK S. Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 41 (1):176-184, 2009.
- BALDINI M., LOHMAN IC., HALONEN M., ERICKSON RP., HOLT PG., MARTINEZ FD. A polymorphism in the 5'flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 20: 976-983, 1999.
- BAYLIN SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2 (Suppl 1):S4-11, 2005.
- BOBETSIS YA, BARROS SP, LIN DM, WEIDMAN JR, DOLINOY DC, JIRTLE RL, BOGGESS KA, BECK JD, OFFENBACHER S. Bacterial infection promotes DNA hypermethylation. *J Dent Res* 86, 169-174, 2007.
- CARDOSO FP; VIANA MB; SOBRINHO AP; DINIZ MG; BRITO JA; GOMES CC; MOREIRA PR; GOMEZ RS. Methylation pattern of the IFN-gama gene in human dental pulp. *Journal of Endodontics* 36: 642-646, 2010.
- Cutler CW, Kalmar JR, Genco CA. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol.*, 3(2): 45-51, 1995.
- De Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE. Interleukin 10. *Curr.Opin.Immunol.*,v.4,p.314-20, 1992.
- FEINBERG AP, TYCKO B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4: 143-153, 2004.

- FITZPATICK D.R.; WILSON C.B. Methylation and demethylation in regulation of genes, cells, and responses in the immune system. *Clinical Immunology* 109: 37-45, 2003.
- FU LH, CONG B, ZHEN YF, LI SJ, MA CL, NI YZ, ZHANG GZ, ZUO M, YAO YX: Methylation status of the IL-10 gene promoter in the peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *Yi Chuan* 29, 1357-1361, 2007. (abstract)
- FUKS F, BURGERS WA, BREHM A, HUGHES-DAVIES L, KOUZARIDES T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 24 (1):88-91, 2000.
- FUTURA T, SHUTO T, SHIMASAKI S, OHIRA Y, SUICO M, GRUENERT D, HAI H. DNA demethylation-dependent enhancement of toll-like receptor-2 gene expression in cystic fibrosis epithelial cells involves SP1-activated transcription. *BMC Mol Biol* 21: 9-39, 2008.
- GAZZAR ME, YOZA BK, HU J, COUSART SL, MCCALL CE. Epigenetic silencing of tumor necrosis α during endotoxin tolerance. *J Biol Chem* 282, 26857-26864, 2007.
- Gemmell E, Woodford V, Seymour GJ. Characterization of T lymphocyte clones derived from *Porphyromonas gingivalis* infected subjects. *J.Periodontol.Res.*, v.31, p.47-56,1996.
- GOPISETTY G.; RAMACHANDRAN K.; SINGAL R. DNA methylation and apoptosis, *Molecular Immunology*, 43:1729-1740, 2006.
- HA PK, CALIFANO JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol* 7: 77-82, 2006.
- HAFFAJEE,A.D. & SOCRANSKY,S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases.*Periodontology* 2000, v.5, p.78-111,1994.
- HARDING FA, MCARTHUR JG, GROSS JÁ, RAULET DH, ALLISON JP. CD28- mediated signalling co-estimates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*, 356 (6370):607-609, 1992.
- HATHCOCK K, LASZLO G, PUCILLO C, LINSLEY P, HODES R. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *The Journal of Experimental Medicine* 180:631-640, 1994
- Hayashi J, Masaka T, Ishikawa I. Increased levels of soluble CD14 in sera of periodontitis patients. *Infec. and Immunity*.v.67, n.1, p.417-20, 1999.
- JOHNSON IT, BELSHAW NJ: Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. *Food Chem Toxicol* 46, 1346-1359, 2008.
- JONES PL, VEENSTRA GJ, WADE PA, VERMAAK D, KASS SU, LANDSBERGER N, STROUBOULIS J, WOLFFE AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19, 187-191, 1998.
- KISHI M, NAKAMURA M, NISHIMINE M, IKUTA M, KIRITA T, KONISHI N. Genetic and

- epigenetic alteration profiles for multiple genes in salivary gland carcinomas. *Oral Oncology* 41: 161-169, 2005.
- Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG Jr, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J.Clin.Periodontol.*, v.24, p.72-77, 1997.
- LANCASTER GI, KHAN Q, DRYSDALE P, WALLACE F, JEUKENDRUP AE, DRAYSON MT, GLEESON. The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *J. Physiol* 563(3):945-955, 2005.
- LIMA, P.M. Reatividade celular na doença periodontal: participação de citocinas, moléculas de adesão e subpopulações leucocitárias na resposta inflamatória de pacientes com diferentes formas clínicas da doença. *Tese de doutorado-UFMG*, 2003.
- LOOS BG, JOHN RP, LAINE ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J. Clin Periodontol*, 32 (Suppl.6): 159-179, 2005.
- MADIANOS PN, BOBETSIS YA, KINANE DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J.Clin. Periodontol.* 32 (Suppl6):57-71, 2005.
- MARTINS, P.H.F. *Mecanismos patogênicos na doença periodontal: aspectos imunológicos*, Belo Horizonte: Faculdade de odontologia da UFMG, 1997.
- McDevitt MJ, Wang HY, Knobelmann C, Newman MG, di Giovine FS, Timms J, Duff GW, Kornman KS. Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *J.Periodontol.*, v.71, n.2, p.156-163, 2000.
- MOREIRA PR, COSTA JE, GOMEZ RS, GOLLOB KJ, DUTRA WO. The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res*; 42(1):23-30, 2007.
- MOREIRA PR, DE SA AR, XAVIER GM, COSTA JE, GOMEZ RS, GOLLOB KJ, DUTRA WO. A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res*; 40(4):306-11, 2005.
- MOREIRA PR, GUIMARAES MM, GUIMARAES ALS, DINIZ MG, GOMES CC, BRITO JAR, GOMEZ RS. Methylation of *P16*, *P21*, *P27*, *RB1* and *P53* genes in odontogenic keratocysts. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 38: 99–103, 2009.
- MOREIRA PR, LIMA PM, SATHLER KO, IMANISHI SA, COSTA JE, GOMEZ RS, GOLLOB KJ, DUTRA WO. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol*;148(1):119-26, 2007.
- MOREIRA PR; GUIMARAES MM; GOMES CC; DINIZ MG; BRITO JA; CASTRO WH; GOMEZ RS. Methylation frequencies of cell-cycle associated genes in epithelial odontogenic tumors. *Archives of Oral Biology* 54: 893-897, 2009.

- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. TWO TYPES OF MURINE HELPER T CELL CLONE. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.*,v.136,p.2348-2357,1986.
- NAN X, NG HH, JOHNSON CA, LAHERTY CD, TURNER BM, EISENMAN RN, BIRD A: Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389, 1998.
- NARLIKAR GJ, FAN HY, KINGSTON RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108: 475-487, 2002.
- NG HH, BIRD A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* 9: 158-163, 1999.
- OFFENBACHER S, BARROS SP, BECK JD: Rethinking periodontal inflammation. *J Periodontol* 79, 1577-1584, 2008.
- OHI T, UEHARA Y, TAKATSU M, WATANABE M, ONO T. Hypermethylation of CpG in the promoter of the COL1A1 gene in the aged periodontal ligament. *J Dent Res* 85:245-250, 2006.
- 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.*; 36(9):719-25; 2009.
- PAGE, R. C. Advances in the patogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology*2000.v.14, p.216-248, 1997.
- PAGE, R.C. e KORNMAN, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: na introduction.*Periodontology*2000, v.14, p.9-11, 1997.
- PAGE, R.C., SCHROEDER,H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation*, 34: 235-249, 1976.
- PALMA-CARLOS, A.G & PALMA-CARLOS, M.L. Adhesion molecules in immunity and inflammation. *Allerg Immunol.*, v.21, p.4-9, 1993.
- RAZMA AG, LYNCH JP, WILSON BS, WARD PA, KUNKEL SL. Expression of Ia-like (DR) antigen on human alveolar macrophages isolated by bronchoalveolar lavage. *Am.Ver.Resp.Dis.* 129(3):419-424, 1984.
- REINER SL. Epigenetic control in the immune response. *Hum Mol Genet* 14: R41-46, 2005.
- RODENHISER D, MANN M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMA* 174: 341-348, 2006.
- SÁNCHEZ-PERNAUTE O, OSPELT C, NEIDHART M, GAY S: Epigenetic clues to rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 30, 12-20, 2008.
- SANDERS, VM. Epigenetic regulation of Th1 and Th2 cell development. *Brain Behav Immun* 20,

317-324, 2006.

-SCHENKEIN H.A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontology* 2000, v.40: 77-93, 2006.

-SEYMOUR GJ., GEMMELL E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand*, 59:167-173, 2001.

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

-SHUTO T, FUTURA T, OBA M, XU H, LI J, CHEUNG J, GRUENERT D, UEHARA A, SUICO M, OKIYONEDA T, KAI H. Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *FASEB J* 20 (6): 782-4, 2006.

-SOUZA PE, ROCHA MO, MENEZES CA, COELHO JS, CHAVES AC, GOLLOB KJ, DUTRA WO. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of co-stimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from indeterminate and cardiac Chagas disease patients. *Infect Immun*. 2007.

-STENVINKEL P, KARIMI M, JOHANSSON S, AXELSSON J, SULIMAN M, LINDHOLM B, HEIMBÜRGER O, BARANY P, ALVESTRAND A, NORDFORS L., QURESHI AR, EKSTRÖM TJ, SCHALLING M: Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation – a novel risk factor for cardiovascular disease? *J Intern Med* 261, 488-499, 2007.

-SUGAWARA S., SUGIYAMA A, NEMOTO E., RIKIISHI H., TAKADA H. Heterogeneous expression and release of CD14 by human gingival fibroblasts: characterization and CD14 mediated interleukin 8 secretion in response to lipopolysaccharide. *Infect Immunol.*, v.66, 3043-3049, 1998.

-SULLIVAN KE, REDDY ABM, DIETZMANN K, SURIANO AR, KOCIEDA VP, STEWART M, BHATIA M: Epigenetic regulation of tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 27, 5147-5160, 2007.

-TANAKA S., BARBOUR SE., BEST AM., SCHENKEIN HÁ., TEW JG. Prostaglandin E2-mediated regulation of immunoglobulin G2 via interferon gamma. *J. Periodontol*, v.74, 771-779, 2003.

-Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.*, v.9, p.866-73, 1995.

-VAISSIÈRE T, SAWAN C, HERCEG Z: Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res* 659, 40-48, 2008.

-VAN-DYKE, T.E., SHEILESH, D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol* 7 (1):3-7, 2005.

-WALUNAS TL, LENSCHOW DJ, BAKKER CY, LINSLEY PS, FREEMAN GJ, GREEN JM, THOMPSON CB, BLUESTONE JÁ. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405-413, 1994.

-Wang PL, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, Tanaka J. DNA microarray analysis of human gingival fibroblast from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*,305(4): 970-3, 2003.

-WHITE GP, WATT PM, HOLT BJ, HOLT PG. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells. *J. Immunol* 168, 2820-2827, 2002.

-WILSON AG. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *J. Periodontol* 79:1514-1519, 2008.

-ZAMPETAKI A, XIAO Q, ZENG L, HU Y, XU Q. TLR4 expression in mouse embryonic stem cells and in stem cell-derived vascular cells is regulated by epigenetic modifications. *Biochem Biophys Res Commun* 18;347(1):89-99, 2006.

-ZHANG S, BARROS SP, NICULESCU MD, MORETTI AJ, PREISSER JS, OFFENBACHER S. Alteration of PTGS2 promoter methylation in chronic periodontitis. *J Dent Res.*; 89(2):133-7; 2010.