

MICHELLE BEATRIZ VIANA

**ESTUDO DA METILAÇÃO NOS GENES *IFN- γ* E *IL-10* NA
DOENÇA PERIODONTAL**

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Odontologia

Belo Horizonte

2009

MICHELLE BEATRIZ VIANA

**ESTUDO DA METILAÇÃO NOS GENES *IFN- γ* E *IL-10* NA
DOENÇA PERIODONTAL**

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

Orientador: Prof. Dr. José Eustáquio da Costa

Co-orientadora: Dra. Paula Rocha Moreira

Belo Horizonte

2009

Este trabalho contou com a colaboração:

- pesquisadores:

Dr. Ricardo Santiago Gomez

Dr. Fernando Oliveira Costa

- alunos:

Marina Gonçalves Diniz

Fabiano Pereira Cardoso

AGRADECIMENTOS

A Deus que teve o papel principal nessa jornada acadêmica; por me dar coragem, força e determinação. “ Senhor eu sei que tu me amas.”

Ao professor Dr. José Eustáquio da Costa, pelo voto de confiança e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A minha co-orientadora Paula Rocha Moreira, por ter acreditado neste trabalho e na minha competência para desenvolvê-lo, pelas atitudes positivas sempre, pelo carinho, atenção, competência e dedicação. Muito obrigada!

Ao professor Dr. Ricardo Santiago Gomez, pela acolhida no laboratório de biologia molecular, pelo seu apoio e por suas orientações tão importantes na construção desta pesquisa.

Ao professor Dr. Fernando Oliveira Costa, pelas valiosas contribuições durante a execução deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular, pela disponibilidade em ajudar sempre.

Em especial

ao Flávio, pela oportunidade de acompanhar seus experimentos, pela paciência em me ensinar, por sua participação no projeto deste trabalho. Obrigada por me ajudar a dar os primeiros passos em direção à biologia molecular,

ao meu colega de experimentos Fabiano, por compartilharmos os mesmos “genes”. Muito obrigada por sempre ter uma palavra de incentivo nas horas em que mais precisei,

a Marina Diniz, por sua contribuição nos experimentos de sequenciamento.

Aos amigos da “Perio” pelas conversas, pelo incentivo, pelos trabalhos desenvolvidos, pelas trocas, pelos momentos de descontração. Foi muito bom ter convivido com vocês.

Em especial, a Luís Otávio de Miranda Cota

Aos meus familiares, pelo apoio e carinho.

Aos amigos que compreenderam a minha ausência.

À minha querida mãe, pelo exemplo de coragem e persistência, pelas palavras certas nas horas que mais precisei, pelo seu apoio e por seu amor incondicional que posso contar sempre. Sem você eu nada seria.

À minha avó, por sua perseverança, por me ensinar que não devemos desistir nunca, mesmo quando pensamos não ser possível.

Ao Takeshi, por ter dado um novo sentido a minha vida. Com certeza esse caminho teria sido muito mais difícil sem você. Obrigada, pelo carinho, paciência, apoio e por todo o cuidado que teve comigo. Seu amor foi essencial para que eu conseguisse chegar até aqui.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Aos pacientes participantes desta pesquisa, que tiveram a disponibilidade em doar as amostras para os experimentos, desejo-lhes muitas felicidades.

Ao Aníbal, por seu carinho e pela valiosa correção de português deste trabalho.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

RESUMO

A metilação do DNA é um fator epigenético caracterizado pela adição de um grupo metil em citosinas de regiões CpG, promovendo modificações na estrutura do DNA sem envolver alterações na seqüência de nucleotídeos. A presença de metilação na região promotora dos genes pode provocar o silenciamento transcricional dos mesmos. Alterações epigenéticas podem ocorrer em genes de citocinas afetando a expressão dessas moléculas envolvidas no processo inflamatório. Estudos recentes apontam para a participação da metilação em genes de citocinas na patogênese de algumas doenças inflamatórias. O objetivo do presente estudo foi verificar a presença de metilação nos genes *IFN- γ* e *IL-10* na doença periodontal e avaliar seu impacto na gravidade da doença. Foram avaliadas amostras de tecidos periodontais de indivíduos com gengivite e de indivíduos com periodontite crônica. Para a análise do gene *IFN- γ* utilizou-se a técnica do MSP que usa *primers* específicos para o DNA metilado e não metilado. A metilação do gene *IFN- γ* foi frequente nas amostras avaliadas. Não houve diferença na presença de metilação entre os grupos e também em relação à gravidade da doença periodontal. Esses resultados sugerem que a metilação do gene *IFN- γ* é um evento comum nos tecidos periodontais inflamados. Em relação ao padrão de metilação no gene *IL-10*, avaliado pelo sequenciamento das amostras, foram observados apenas CpGs totalmente ou parcialmente metilados, em ambos os grupos. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos, quando comparados os CpGs totalmente metilados. Esses resultados mostram que a metilação do gene *IL-10* pode ser um evento comum nos tecidos periodontais inflamados. Acreditamos que mais estudos são necessários para uma melhor compreensão sobre mecanismos epigenéticos e suas influências na doença

periodontal, contribuindo assim para o esclarecimento de aspectos importantes na patogênese dessa doença.

Palavras-chaves: Metilação, Genes de citocinas, Doença Periodontal.

ABSTRACT

DNA methylation is characterized by the addition of methyl groups in cytosines within CpG islands. Unmethylated CpGs are related with transcriptionally active structure, whereas methylated CpG recruits methyl-binding proteins that promotes chromatin compaction. DNA methylation can influence the expression of cytokines and to affect the development of periodontal disease. The purpose of the present study was to evaluate the methylation status of the interferon gamma (IFN- γ) and interleukin-10 (IL-10) gene in periodontal tissues. Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) and DNA sequencing analysis were used to verify the DNA methylation status of the IFN- γ and IL-10 gene, respectively, in samples from no periodontitis subjects and individuals with chronic periodontitis. Histologic sections stained by hematoxylin-eosin were used for histopathological evaluation of samples. The methylation status of the IFN- γ and IL-10 gene were similar among the groups. Most of samples were positive for IFN- γ methylation. Only 11% of periodontitis group showed unmethylated DNA. Considering IL-10 gene, no unmethylated sample was observed. The profile of total or partial methylation were detected in CpGs evaluated. The results showed evidence that methylation of IFN- γ and IL-10 genes are usual features on periodontal tissues. Further studies are necessary to determine the functional relevance of these alterations.

Keywords: methylation, cytokines, inflammation, periodontitis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos géis de PCR do gene <i>IFN-γ</i>	48
Figura 2 - Padrão de metilação do gene <i>IFN- γ</i> considerando a gravidade da periodontite crônica.....	50
Figura 3 - Representação do gel de PCR para o gene <i>IL-10</i>	51
Figura 4 - Eletroferograma representativo de CpG totalmente e parcialmente metilado.....	52
Figura 5 - Padrão de metilação de 8 CpGs da região promotora do gene <i>IL-10</i> ...	53
Figura 6 - Porcentagem de amostras metiladas por CpGs específicos nos grupos gengivite e periodontite.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas dos grupos de estudo.....	40
Tabela 2 - Resultados do MSP para o gene <i>IFN-γ</i>	49
Tabela 3 - Frequência do padrão de metilação.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP - *American Academy of Periodontology*

AgNO₃ – *Nitrato de Prata*

C - *Citosina*

CD4 - *Cluster of differentiation 4*

CMSP – *Células Mononucleares de Sangue Periférico*

DNA - *Ácido Desoxirribonucléico*

DNMT - *DNA Metiltransferases*

DP - *Doença Periodontal*

FO-UFMG - *Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais*

FIG – *Figura*

F- *Foward*

FCG - *Fluido Crevicular Gengival*

G – *Guanina*

GLB - *Gel Load Buffer*

HDAC - *histone deacetilase*

H₂O - *Água*

IL- *Interleucina*

IFN- γ – *Interferon gama*

LPS - *Lipopolissacarídeo*

MSP *Reação em cadeia de polimerase metilação específica.*

Min – *Minutos*

NK - *Célula Natural Killer*

Pb - *Pares de Bases*

PS - *Profundidade de Sondagem*

PI - *Perda de Inserção*

PC - *Periodontite Crônica*

PCR – *Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase*

PGE - *Prostaglandinas*

RNA - *Ácido Ribonucléico*

RT-PCR - *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*

R - *Reverse*

S - *Segundos*

SI - *Sistema Imune*

Th - *Célula T Auxiliar*

TNF – *Fator de Necrose Tumoral*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 DOENÇA PERIODONTAL.....	18
2.2 CITOCINAS.....	21
2.2.1 INTERFERON GAMA.....	25
2.2.2 INTERLEUCINA -10.....	26
2.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS.....	28
2.3.1 METILAÇÃO DO DNA.....	29
2.3.2 METILAÇÃO NOS GENES DE CITOCINAS	31
2.3.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS E DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS.....	33
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4 ASPECTOS ÉTICOS.....	38
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAS.....	39
5.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA A ANÁLISE.....	41
5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	41
5.4 EXTRAÇÃO DO DNA.....	41
5.5 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO.....	42
5.6 METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO NO GENE <i>IFN-γ</i>.....	42
5.6.1 MSP-PCR (REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE METILAÇÃO ESPECÍFICA) DO GENE <i>IFN-γ</i>.....	42
5.7 METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO NO GENE <i>IL-10</i>.....	44
5.7.1 PCR, PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>IL-10</i> DO GENE <i>IFN-γ</i>.....	44
5.8 ANÁLISE ESTÁTISTICA.....	46
6 RESULTADOS.....	47
6.1 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	47
6.2 RESULTADOS DO MSP DO GENE <i>IFN-γ</i>.....	47
6.3 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>IL-10</i>.....	51

7 DISCUSSÃO.....	55
8 CONCLUSÃO.....	62
9 REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO A - Termo de esclarecimento e termo de livre consentimento.....	73
ANEXO B - Ficha Clínica.....	75
ANEXO C - Tratamento do DNA com bissulfito de sódio.....	78
ANEXO D - Precipitação do DNA com Isopropanolol/ Etanol.....	81

1 INTRODUÇÃO

Doenças periodontais (DP) são infecções polimicrobianas que provocam a destruição das estruturas de sustentação do dente, como resultado de uma ação do sistema de defesa do hospedeiro, em resposta ao acúmulo de placa (KINANE E HART, 2003; KINANE E LINDHE, 2005).

Este processo patogênico apresenta diferenças na extensão e gravidade no próprio indivíduo e entre indivíduos, sendo as razões para isso multifatoriais (KINANE E LINDHE, 2005). Sua progressão parece não ocorrer de forma contínua, mas de maneira episódica, em pequenos períodos de atividade que são seguidos por longos períodos de remissão (LINDHE et.al., 1989; ALBANDAR, 1990). Durante a atividade da doença é observada uma destruição periodontal mediada por citocinas (GOMEZ; DUTRA E MOREIRA, 2009).

Patógenos e seus fatores de virulência ativam a resposta imuno-inflamatória, promovendo a liberação de citocinas, produtos ativadores de complemento, quininas e metaloproteinases. Alguns desses mediadores inflamatórios participam da destruição óssea e do ligamento periodontal (ISHIKAWA, 2007). Dentre estes mediadores, destacam-se: interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-10 (IL-10). IFN- γ é um tipo de citocina pró-inflamatória produzida principalmente por células T, cujo aumento na sua produção está relacionado à progressão e à gravidade da doença periodontal (GARLET et al., 2003). Por outro lado, a IL-10 é uma citocina antiinflamatória, importante na limitação das respostas imuno-inflamatórias, por inibir a função efetora em células T (SZALMÁS et al., 2008).

A doença periodontal é influenciada pelos microorganismos da lesão subgingival, por doenças sistêmicas adquiridas que reduzem ou alteram a

resistência orgânica e por fatores ambientais. Entretanto, existe um reconhecimento crescente que há um forte componente genético na susceptibilidade à periodontite (OFFENBACHER, 1996).

Novos avanços na medicina e na biologia molecular começam a ter impacto na patogênese da DP. Apesar da natureza multifatorial da periodontite, é possível identificar genes que lhe confere susceptibilidade. Acredita-se que os genes responsáveis pela resposta imune desempenham um papel crucial na patogênese da periodontite. Pesquisadores têm focado sua atenção na identificação de polimorfismos genéticos em mediadores da resposta imune, como as citocinas, que vêm sendo usados potencialmente como fatores de suscetibilidade em relação à doença (OFFENBACHER, 1996).

Genes de citocinas são alvos de múltiplos mecanismos epigenéticos tais como metilação, desmetilação do DNA e modificações na histona como acetilação, metilação, fosforilação (FITZPATRICK E WILSON, 2003; ADCOCK et al., 2007). A presença de alterações epigenéticas na região promotora desses genes pode afetar a habilidade celular de expressar citocinas (SANDERS, 2006).

A importância desses mecanismos nas áreas de desenvolvimento e de biologia do câncer está estabelecida, e seu conhecimento na área da imunologia está em crescimento (FITZPATRICK E WILSON, 2003). Pesquisas recentes evidenciam a importância desses fatores na patogênese de algumas doenças, principalmente naquelas que envolvem a resposta inflamatória (WILSON, 2008), tais como: gastrite crônica (BOBETSI et al., 2005), bronquite asmática (KWON et al. 2008) e periodontite (OFFENBACHER, BARROS, BECK, 2008).

Eventos epigenéticos são capazes de alterar a produção de citocinas, conseqüentemente influenciando na patogênese e no resultado de muitas doenças

infeciosas (STENVINKEL et al, 2007; BOBETSIS et al, 2007). Essas descobertas têm relevância para alterações inflamatórias cuja regulação é determinada pela expressão de citocinas. Além disso, sugere-se que a presença de inflamação crônica e a infecção bacteriana promovam a metilação do DNA (STENVINKEL et al, 2007; BOBETSIS et al, 2007).

Estudos indicam que as características clínicas da DP podem ser influenciadas por fatores genéticos e epigenéticos. Está claro que determinantes genéticos da resposta inflamatória modulam a expressão da doença. Muitos fatores associados à periodontite incluindo acúmulo de placa bacteriana, fumo e diabetes são capazes de provocar alterações epigenéticas nos tecidos periodontais, o que propõe o envolvimento de um componente epigenético nas diferentes respostas inflamatórias no próprio indivíduo e entre indivíduos (OFFENBACHER, BARROS e BECK, 2008).

Considerando a natureza complexa e multifatorial da doença periodontal é possível assumir que eventos epigenéticos influenciem no estabelecimento e na progressão da doença. Como tem sido demonstrado que mecanismos epigenéticos podem ter impacto em desordens inflamatórias e devido à escassez de informações sobre esses eventos na periodontite, a pesquisa nessa área poderá aprimorar o conhecimento sobre a patogênese dessa doença (GOMEZ; DUTRA E MOREIRA, 2009).

Tendo em vista que a presença de metilação em genes de citocinas pode interferir na patogênese das doenças inflamatórias, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a ocorrência da metilação do DNA nos genes *IFN- γ* e *IL-10* na gengivite e periodontite crônica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal é uma doença infecciosa caracterizada pela ocorrência de reação inflamatória destrutiva, que pode levar à subsequente perda de tecido de suporte dentário. É a doença óssea mais prevalente em humanos e importante causa de perda dental em adultos (PAGE, 1997).

A DP caracteriza-se por uma diversidade de manifestações clínicas que acometem o periodonto, caracterizadas pela formação de bolsa periodontal, migração do epitélio juncional, destruição de tecido ósseo e conjuntivo (MOORE E MOORE, 1994). São comumente divididas em infecções que afetam somente os tecidos gengivais (gengivite) e aquelas que acometem o tecido periodontal de suporte, incluindo o ligamento periodontal e osso alveolar (periodontite) (GRENNIER E MAYRAND, 2000).

O diagnóstico de gengivite geralmente implica que não ocorreu perda de inserção no periodonto, sendo caracterizada clinicamente por vermelhidão, tumefação gengival e uma tendência aumentada de sangramento dos tecidos moles à sondagem delicada (KINANE E LINDHE, 2005). Por outro lado, na periodontite ocorre uma inflamação no periodonto de suporte, perda dos tecidos de inserção e reabsorção óssea. Nessa forma de doença, a recessão gengival e a ocorrência de bolsas periodontais são sinais clínicos comuns.

De acordo com a classificação das doenças periodontais, proposta por Armitage (1999), duas categorias principais de DP foram estabelecidas: a

periodontite crônica e a periodontite agressiva. A periodontite crônica apresenta uma taxa de progressão frequentemente baixa sendo caracterizada por eventuais episódios ou surtos de atividade da doença e por presença de irritantes locais compatíveis com a gravidade da doença. Embora ocorra mais comumente em adultos, pode ser encontrada também em crianças e adolescentes (ARMITAGE, 1999). Pode estar associada a fatores locais, ser modificada ou estar associada a fatores sistêmicos e ser alterada por fatores comportamentais (ARMITAGE, 1999). A periodontite agressiva difere da periodontite crônica pela alta taxa de progressão, que leva a uma avançada destruição periodontal associada à perda precoce do dente. A quantidade de deposição microbiana é incompatível com a gravidade da destruição periodontal, mas pode haver uma tendência familiar sendo que essa forma de periodontite ocorre de uma maneira localizada ou generalizada (ARMITAGE, 1999; CALIFANO, 2003).

Independentemente da forma clínica, infecção e inflamação constituem marcos fundamentais da DP. A presença de reação inflamatória no periodonto, visível clínica e microscopicamente representa uma resposta do hospedeiro suscetível aos microorganismos da placa dental e seus produtos, que estão em constante contato com o epitélio sulcular e juncional (OFFENBACKER, 1996; SCHENKEIN, 2006). A resposta do hospedeiro à infecção depende da natureza e da virulência dos patógenos e de fatores genéticos e ambientais (BORREL E PAPAPANOU, 2007).

A etiologia primária da doença periodontal consiste de bactérias específicas, predominantemente anaeróbias gram-negativas (HAFFAJEE e 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).

As bactérias periodontopatogênicas são capazes de promover uma degradação dos tecidos do hospedeiro, através da liberação de uma variedade de produtos biologicamente ativos, como lipopolissacarídeos (endotoxinas), peptídeos quimiotáticos, toxinas proteicas e ácidos orgânicos (OFFENBACKER, 1996)

As moléculas liberadas pelo biofilme dental estimulam o hospedeiro a produzir vários mediadores, entre eles a produção e liberação de citocinas, incluindo a interleucina-1 beta ((IL-1 β)), a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-8 (IL-8), IFN- γ , IL-10, prostaglandinas, e o fator de necrose tumoral (TNF- α), (SASAKI et al., 2000; GAFFAR e VOLPE, 2004). Essas citocinas secretadas aumentam a infiltração linfocitária, a reabsorção óssea e a dissolução da matriz extracelular (OFFENBACKER, 1996). Há também evidências cada vez maiores de que células predominantes do periodonto, os fibroblastos, são capazes de produzir prostaglandinas, interleucinas, TNF- α , e IFN- γ (GAFFAR e VOLPE, 2004).

Os processos inflamatórios agem nos tecidos gengivais para proteger contra o ataque microbiano e impedir que os microrganismos se disseminem ou invadam os tecidos (GALET et al., 2003; KINANE, BERGLUNDH e LINDHE, 2005). Os estágios iniciais da doença periodontal representam uma evolução inflamatória acompanhada de modificações no tecido conjuntivo e epitélio juncional. A lesão inicial é caracterizada pela presença de um infiltrado celular composto principalmente por macrófagos e linfócitos T (PAGE E SCHROEDER, 1976). A lesão avançada ocorre quando a inflamação se estende para o ligamento periodontal e osso alveolar, verificando-se uma contínua perda de fibras colágenas subgengivais

próxima à bolsa periodontal, presença de reabsorção óssea e aumento de linfócitos B e plasmócitos (PAGE E SCHROEDER, 1976).

De acordo com Allisson e Lanier (1987), está bem definido que o sistema imune do hospedeiro é essencial no processo da doença, apesar das bactérias apresentarem um papel claro na patogênese da gengivite e periodontite. As células do sistema imune estão amplamente distribuídas pelo organismo e, na presença de um processo infeccioso, há necessidade de concentrar essas células e seus subprodutos no local da infecção (ALLISSON E LANIER, 1987). O processo inflamatório que ocorre na doença periodontal é caracterizado pela infiltração linfocitária (GRAVES, 2008) e pela adesão dos leucócitos ao endotélio, assim como sua posterior migração para o tecido (TEDDER et al., 1995). Esse recrutamento leucocitário é promovido por diversos fatores, incluindo produtos bacterianos, citocinas, quimiocinas e complemento (GRAVES, 2008). A atividade biológica dessas citocinas pode ser diretamente relevante para a destruição periodontal, como a perda de inserção, a destruição de colágeno e a reabsorção óssea (GÓRSKA et al., 2003).

2.2 CITOCINAS

Devido à natureza inflamatória da doença periodontal, as citocinas desempenham um papel essencial nos mecanismos imunopatológicos (GEMMELL; YAMAZAKI E SEYMOUR, 2002). Essas 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 da atividade inflamatória. O equilíbrio entre estas citocinas e de atividades por elas coordenadas, associados a outros fatores, podem definir estágios diferentes da inflamação (GEMMELL; YAMAZAKI E SEYMOUR, 2002).

Na doença periodontal, a presença dos produtos bacterianos apresenta a habilidade de induzir uma ampla resposta pró-inflamatória, estimulando a produção de citocinas (MADIANOS; BOBETSIS E KINANE, 2005).

As citocinas são proteínas solúveis, com grande espectro inflamatório, hematopoiético, metabólico e com propriedades imunorreguladoras, sendo secretadas por macrófagos, células dentríticas, linfócitos, células endoteliais e fibroblastos (GRÓSKA et al., 2003). Esses polipeptídeos agem como mensageiros transmitindo sinais para outras células e realizam numerosas ações que incluem o início e a manutenção da resposta imunoinflamatória, a regulação do crescimento e diferenciação celular (OFFENBACKER, 1996).

As interleucinas (IL) são membros importantes do grupo das citocinas e encontram-se envolvidas, principalmente, na comunicação entre leucócitos e outras células que participam dos processos imune e inflamatório, como as células epiteliais, endoteliais e fibroblastos (OFFENBACKER, 1996). Além das interleucinas, as citocinas também incluem fatores de crescimento, quimiocinas que atuam no recrutamento celular, e interferons que são importantes moléculas ativadoras de linfócitos (OFFENBACKER, 1996).

As citocinas podem ser classificadas segundo suas ações ou propriedades, tais como ações pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, ou por seu papel como fatores de crescimento ou efeitos hematopoiéticos etc. As citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, interleucina 2 (IL-2), IL-6, IL-8, interleucina 12 (IL-12),

TNF- α , e IFN- γ , promovem a ativação do processo inflamatório, auxiliando na eliminação de patógenos (MARQUES; CIZZA E STENBERG, 2007). Elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias resulta na ativação dos macrófagos, células natural killer (NK), células T e células B; proliferação de células T e células B; e proliferação e secreção de imunoglobulinas. No nível sistêmico, as citocinas demonstraram induzir febre e aumentar a síntese de proteínas da fase aguda. Localmente, promovem o recrutamento de células inflamatórias para os sítios da inflamação. Algumas citocinas são responsáveis pelo recrutamento, ativação e retenção dos leucócitos nos sítios de inflamações locais (MARQUES; CIZZA E STENBERG, 2007). Já as citocinas anti-inflamatórias, tais como interleucina 4 (IL-4), IL-10, interleucina 13 (IL-13), TGF- β , reduzem a resposta inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão da ativação de monócitos. Adicionalmente, as citocinas exercem seus efeitos dependendo do local de ação. Por exemplo, a IL-8 tem uma ação pró-inflamatória em sítios de inflamação locais, ao passo que, em alta concentração e no compartimento intravascular, exerce uma ação anti-inflamatória (MARQUES; CIZZA E STENBERG, 2007).

As citocinas podem também ser classificadas pela fonte de produção do linfócito T helper, se produzidas pelos linfócitos T helper 1 (Th-1) ou T helper 2 (Th-2). Os linfócitos Th-1 liberam citocinas que ativam macrófagos, células NK, neutrófilos, linfócitos citotóxicos, ampliando assim a resposta imunológica celular (e.g. IFN- γ , IL-1, IL-6, TNF- α , IL-2). Por outro lado, as citocinas Th-2 (e.g. IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TGF- β) ampliam a resposta humoral por meio da ativação das células B. As citocinas Th-1 são principalmente pró-inflamatórias, enquanto as citocinas Th-2 são principalmente anti-inflamatórias (GRÓSKA et al., 2003; MARQUES; CIZZA E STENBERG, 2007).

As células T possuem um papel imunorregulatório importante na patogênese da DP (ISHIKAWA, 2007). Em razão de seus principais produtos agirem antagonicamente, o IFN- γ inibe a proliferação de Th2 enquanto IL-4 e IL-10 inibem a síntese de citocinas por Th1, pode-se dizer que há uma mútua regulação entre as respostas Th1 e Th2 (MOSSMAN E SAD, 1996).

Durante a resposta imune, um perfil de citocinas Th1 ou Th2 pode dominar indicando uma polarização da resposta. Pode-se ainda observar um perfil misto de produção de citocinas Th1 e Th2, que caracteriza uma outra sub-população denominada Th0 (MOSSMAN E COFFMAN, 1989). Alguns pesquisadores acreditam que as células Th0 são apenas precursoras ainda não totalmente diferenciadas das células Th1 e Th2, outros acreditam que essas células representam uma população com características próprias (MINER E CROFT, 1999). A natureza dessa resposta tem sido avaliada em diversas doenças (COFFMAN, 2006), inclusive na DP, apresentando resultados conflitantes.

Resultados têm frequentemente 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 DP. Outros resultados favorecem a hipótese que as lesões da periodontite crônica são mais associadas com uma resposta Th2, enquanto a resposta com periodontite agressiva parece estar polarizada em direção a Th1 (SCHEINKEIN, 2006). Os estudos histológicos caracterizam as lesões iniciais de gengivite clínica como consistentes em uma resposta Th1, enquanto que as lesões avançadas como consistentes com uma resposta Th2 (SEYMOUR E GEMMELL, 2001).

Assim, a polarização da resposta imune local por células Th pode determinar a estabilidade ou a progressão da doença. A resposta imune polarizada por Th1, caracterizará uma resposta celular inflamatória, e por Th2, uma resposta imune humoral com características anti-inflamatórias (SEYMOUR E GEMMELL, 2001; GEMMEL; YAMAZAKI E SEYMOUR, 2002).

2.2.1- INTERFERON GAMA

O IFN- γ desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase imunológica, particularmente na ativação da resposta imune celular associada a Th1, importante para a defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e virais. Entretanto, a produção excessiva de IFN- γ pode contribuir para a patogênese de doenças inflamatórias, diretamente por efeitos tóxicos ou indiretamente pela ativação de células efectoras citotóxicas, tais como macrófagos (WHITE et al., 2002).

Essa citocina possui um perfil pró-inflamatório, sendo liberada por células Th1 quando ativadas por certos tipos de antígenos (OFFENBACHER, 1996). Elevados níveis de IFN- γ no FCG proporcionam um aumento na resposta de monócitos a lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias periodontopatogênicas (SALVI et al., 1998). Esse aumento gera uma maior secreção por estes monócitos de mediadores pró-inflamatórios responsáveis pelo estímulo à reabsorção óssea, tais como IL-1, TNF- α e prostaglandinas 2 (PGE2). Sugere-se que o IFN- γ seja a citocina mais produzida por células T nos tecidos periodontais inflamados, e o aumento na sua expressão pode estar correlacionado à progressão da doença (ROBERTS; McCAFFERY; E MICHALEK, 1997). Salvi et al. (1998) observou um aumento no nível de IFN- γ no

fluido crevicular gengival (FCG), em ambas periodontite crônica (TSAI, 2007) e agressiva. Segundo Alpagot e colaboradores (2003), a quantidade de IFN- γ em sítios periodontalmente ativos, acompanhados por seis meses, foi significativamente maior do que em sítios inativos, sugerindo o papel dessa citocina na progressão da periodontite.

Após terapia periodontal inicial, observou-se uma redução significativa nas taxas de IFN- γ associada à melhora no índice de sangramento gengival e profundidade de sondagem (PS); e um aumento na expressão de IL-4 (TSAI et al., 2007). Esses dados sugerem que o IFN- γ é predominante nas lesões periodontais crônicas e a citocina IL-4 está envolvida com a remissão ou melhora da inflamação periodontal (UKAI et al., 2001; TSAI et al., 2007).

2.2.2- INTERLEUCINA -10

Durante o processo inflamatório, destaca-se também a importância da citocina anti-inflamatória IL-10 produzida pela ativação de monócitos e células Th2 (DE WALL MALEFYT et al., 1992). Essa citocina apresenta um papel fundamental na regulação da resposta imune e inflamatória, reduzindo significativamente a produção de citocinas e a apresentação de antígenos (GEMMELL et al., 1997). Sua principal função é inibir as respostas imunes do hospedeiro, particularmente as que envolvem macrófagos, diminuindo a capacidade fagocítica dessas células (ABBAS E LICHTMAN, 2005). A sua atividade não afeta apenas o sistema imune, mas, através da modulação de fatores de crescimento, de citocinas e outros mediadores,

pode influenciar processos fisiológicos, como angiogênese, e infecções (DE WALL MALEFYT et al., 1992).

A IL-10 é uma importante supressora da reabsorção óssea estimulada por doença infecciosa, como a doença periodontal, provavelmente atuando via inibição da expressão da citocina IL-1 (SASAKI et al 2000). Além disso, a quimiotaxia de células produtoras de IL-10 e IL-4 pode controlar potencialmente a destruição induzida por células Th1. Conseqüentemente, a alta expressão de IL-10 nos pacientes com periodontite crônica poderia reduzir a gravidade da doença (GARLET et al., 2003). Considerando suas funções, essa citocina anti-inflamatória, apresenta importante papel na doença peridontal.

Tendo em vista que a presença de alterações genéticas e epigenéticas em genes de citocinas podem afetar a expressão dessas moléculas e, como descrito anteriormente, devido à natureza inflamatória da DP, torna-se importante verificar a ocorrência dessas variações nesses genes. A produção alterada de citocinas pode tornar o indivíduo suscetível à periodontite ou à gravidade da doença, uma vez que as citocinas são sintetizadas em resposta a bactérias patogênicas e seus produtos, induzindo e mantendo uma resposta inflamatória no periodonto (GAMONAL et al., 2000).

Estudos têm avaliado a variação genética nos genes mediadores da resposta imune. A presença de polimorfismos funcionais nos genes de citocinas, como IL6 (MOREIRA et al., 2007; TERVONEN et al., 2007), IL-1 (MOREIRA et al., 2005), TNF- α (KINANE et al, 1999), IFN- γ (BABEL et al., 2006) e IL-10 (YAMAZAKI et al., 2001), tem sido descrita e usada como alvo potencial para investigar os fatores de suscetibilidade em relação à periodontite. Entretanto, alterações epigenéticas em genes de citocinas ainda não foram avaliadas na doença periodontal.

2.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Ao longo dos anos, mecanismos epigenéticos envolvendo modificadores no DNA (metilação) e histonas (acetilação, metilação) e seu impacto correspondente na regulação do gene, tem despertado considerável interesse (GOPISETT; RAMACHANDRAM E SINGAL, 2006). Diversas funções celulares, como expressão gênica, reparo do DNA e proliferação celular, são regulados por mecanismos epigenéticos (ADCCOCK et al., 2007).

Fator epigenético refere-se a mudanças hereditárias na expressão dos genes que não são resultantes de alterações na sequência de nucleotídeos do DNA (BAYLIN, 2005). Os dois principais mecanismos epigenéticos são modificações na histona e metilação do DNA. Esses mecanismos podem ativar ou inativar genes que controlam o crescimento celular, proliferação, apoptose, e determinam em que momento o gene é expresso durante o desenvolvimento (ADCCOCK et al., 2007; WILSON, 2008). Os parâmetros de modificações nas histonas e no DNA constituem um programa epigenético único para cada tipo celular, sendo replicado durante sucessivas divisões celulares (GOPISETTY; RAMACHANDRAM E SINGAL, 2006).

A metilação é a modificação mais comum no DNA eucariótico, tendo sido ativamente investigada, devido a sua habilidade de alterar a expressão do gene. Mudanças nos parâmetros da metilação podem ocorrer na forma de hipometilação ou hipermetilação. O DNA hipometilado pode estar associado à reativação do gene ou a instabilidades cromossomais. A hipermetileção na região promotora dos genes por outro lado parece estar envolvida na repressão transcricional (GOPISETTY; RAMACHANDRAM E SINGAL, 2006).

2.3.1 METILAÇÃO DO DNA

A metilação do DNA ocorre por uma adição covalente de um grupo metil no carbono 5' do anel de citosina, resultando em 5-metilcitosina. Esse grupo metil é projetado com maior encaixe no DNA e inibe efetivamente a transcrição (RICHARDSON, 2003; BAYLIN, 2005). A adição do grupo metil é feita por enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMTs) (DNMT1, DNMT2, DNMT3a e DNMT3b) que catalisam essa adição aos resíduos de citosina do DNA (BAYLIN, 2005; ADCOCK et al., 2007). DNMT1 é responsável por manter a metilação do DNA já estabelecida durante a sua replicação e DNMTs3 são mediadoras do estabelecimento de um novo parâmetro de metilação (FITZPATRICK E WILSON, 2003; BAYLIN, 2005; GOPISETTY; RAMACHANDRAM E SINGAL, 2006).

No DNA de mamíferos, 5-metilcitosina é encontrado praticamente em 5% do DNA genômico, principalmente nos dinucleotídeos citosina-guanina, chamadas ilhas de CpG. Essas ilhas são tipicamente encontradas dentro ou próximo das regiões promotoras dos genes, onde a transcrição é iniciada (GOPISETTY; RAMACHANDRAM E SINGAL, 2006; WILSON, 2008). Aproximadamente 50% dos genes de humanos possuem ilhas CpGs, e a maioria dessas ilhas não são metiladas em tecidos normais (GOPISETTY; RAMACHANDRAM E SINGAL, 2006; JOHNSON E BELSHAW, 2008).

Embora a metilação controle a atividade do gene, sozinha ela não é suficiente para inativar a transcrição. A estrutura da cromatina próxima da região promotora dos genes também interfere na metilação e na atividade transcricional. O DNA

genômico é organizado dentro da cromatina, onde a fita de DNA é enovelada em histonas formando os nucleossomos (BACKDAHL; BUSHELL E BECK, 2009).

As histonas são proteínas que podem passar por modificações, tais como acetilação, fosforilação, metilação e ubiquitinação (FITZIPATRICK E WILSON, 2003; BACKDAHL; BUSHELL E BECK, 2009). A acetilação da histona e o espaço do nucleossomo afetam a estrutura da cromatina, regulando, assim a transcrição do gene (BAYLIN, 2005). Nas ilhas CpGs não metiladas, os nucleossomos possuem uma configuração mais aberta, facilitando o acesso aos fatores de transcrição. Quando as ilhas estão hipermetiladas, os nucleossomos tornam-se mais compactados, inibindo o acesso das proteínas que promovem a transcrição (BAYLIN, 2005; BACKDAHL; BUSHELL E BECK, 2009). A acetilação de histonas mantém a cromatina aberta e no seu estado transcricionalmente ativo, permitindo a aglutinação dos fatores de transcrição, histonas acetilases e outros coativadores que promovem a expressão do gene (BAYLIN, 2005).

As DNMTs para regular o silenciamento do gene recrutam proteínas aglutinadoras de metil que interagem com deacetilases de histonas (HDACs) (BAYLIN, 2005). HDAC remove o grupo acetil das histonas levando à compactação da cromatina e impedindo a aglutinação dos fatores de transcrição (EGGER et al., 2004; GOPISET; RAMACHANDRAM E SINGAL, 2006).

O processo de metilação do DNA e as modificações nas histonas estão conectados. A acetilação de histonas trabalha em conjunto com a metilação para regular a transcrição do gene (WILSON, 2008). A acetilação é requerida para manter a cromatina aberta e transcricionalmente ativa, quando o DNA está hipometilado. Contrariamente, ilhas de CpGs hipermetiladas recrutam HDACs que levam a uma

desacetilação das histonas resultando em uma forte interação eletrostática entre histonas e DNA, compactando a cromatina e reprimindo a expressão do gene (GOPISETTY; RAMACHANDRAM E SINGAL, 2006; WILSON, 2008). No entanto, a metilação do DNA é considerada um fator dominante na regulação da transcrição do gene (GOPISETTY; RAMACHANDRAM E SINGAL, 2006).

2.3.2 METILAÇÃO NOS GENES DE CITOCINAS

A metilação do DNA é um dos mecanismos principais durante o desenvolvimento imune, controlando recombinações, a expressão linhagem específica de antígenos na superfície celular e a regulação transcricional de citocinas durante a resposta imune (BONILLA-HENAMO et al., 2005).

A investigação da ocorrência de metilação em genes envolvidos com a resposta imune tem sido realizada em vários trabalhos (BONILLA-HENAO et al., 2005; FITZPATRIC E WILSON, 2003; GALM et al., 2003; ARMENANTE et al.; 1999). Com o objetivo de analisar alterações epigenéticas nesses genes, estudos foram realizados em células T (RICHARDDSON, 2003), em células de mieloma múltiplo (GALM et al., 2003), no carcinoma hepatocelular (YOSHIKAWA et al., 2001), no lúpus eritematoso (BURZUNSKI et al, 2007) e em linfomas (CHEN et al, 2007).

A metilação do DNA ocorre nos linfócitos TCD4+ durante a sua diferenciação em Th1 e Th2, que secretam predominantemente IFN- γ e IL-4, respectivamente. Durante esse processo a expressão de um gene de citocina e o silenciamento de

outro é regulada por mecanismos epigenéticos, demonstrando que a diferenciação Th1/Th2 é dependente de fatores epigenéticos (YANO et al., 2003; SANDERS, 2005).

Alterações epigenéticas em genes codificadores de citocinas, como IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α (WHITE et al., 2002; FITZPATRICK E WILSON, 2003; ADCCOCK et al., 2007; SULLIVAN et al., 2007) também foram avaliadas. White et al. (2002) sugerem que a expressão do gene *IFN- γ* em humanos é regulada pelo padrão de metilação em sua região promotora.

A regulação da transcrição do gene *IFN- γ* também foi observada em ratos (FITZPATRICK et al., 1998). Um aumento na transcrição do gene *IFN- γ* foi correlacionado à hipometilação na região promotora de células Th1 em humanos e a hipermetilação demonstrou inibir a expressão do RNAm e da proteína desse gene em linfócitos (YANO et al., 2003; BONILLA-HENAMO et al., 2005).

A metilação na região promotora do gene *IFN- γ* atua significativamente na diferenciação *in vitro* de células T em Th2, inibindo a conformação aberta da cromatina e o recrutamento de fatores de transcrição. Durante a diferenciação em Th2, a região promotora torna-se hipermetilada e na diferenciação em Th1 permanece hipometilada (YONG et al., 1994; IYANO, et al., 2003; WINDERS; SCHWARTZ E BRUNIQUEL, 2004). De acordo com esses resultados, Jones e Chen (2006) demonstraram que uma metilação isolada no CpG -53 do gene *IFN- γ* é suficiente para inibir sua expressão, durante o desenvolvimento de Th2, por impedir diretamente a aglutinação de fatores de transcrição.

Algumas pesquisas atuais também demonstraram que alterações nos parâmetros de metilação e modificações nas histonas podem ocorrer no gene da *IL-10* durante a diferenciação de células T em Th2, interferindo na expressão desse

gene (SARAIVA et al., 2005). Na artrite reumatóide (AR), a frequência de metilação na região promotora no gene da *IL-10* foi significativamente maior quando comparada aos controles saudáveis. Tais descobertas sugerem que a hipermetilação da região promotora pode ser um mecanismo crucial para a inativação do gene da *IL-10* em AR, evidenciando seu possível envolvimento no início e desenvolvimento dessa doença (FU et al., 2007). Existem evidências de que em células epiteliais normais e neoplásicas o parâmetro de metilação nas CpGs da região promotora é o maior determinante do silenciamento transcricional da expressão de *IL-10* em humanos (SZALMÁS et al., 2008).

Embora seja reconhecido o papel da metilação do DNA no controle de muitos processos imunes, o grau do silenciamento transcricional depende da quantidade de citosinas metiladas nas ilhas de CpG e suas posições dentro da sequência (BONILLA-HENAMO et al., 2005; JOHNSON E BELSHAW, 2008).

2.3.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS E DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS

Está clara a importância do padrão epigenético na regulação do desenvolvimento e ativação celular. Evidências apontam para uma participação desses mecanismos em doenças humanas, incluindo inflamação e desordens neoplásicas (WILSON, 2008). Contudo, a maioria das pesquisas de doenças humanas avalia o padrão de metilação no câncer. O silenciamento epigenético nessa enfermidade está associado com genes supressores de tumor, genes responsáveis pelo reparo do DNA e outros genes responsáveis por fenótipos neoplásicos. Porém a influência epigenética em outras doenças ainda é pouco

conhecida (FITZPATRICK E WILSON, 2003). Com o avanço da biologia molecular e na tentativa de proporcionar novas dimensões aos mecanismos epigenéticos, estudos sobre o padrão de metilação nos genes de citocinas em doenças autoimunes e doenças inflamatórias têm sido propostos (RICHARDSON, 2003; OFFENBACHER; BARROS E BECK, 2008).

Estudos epigenéticos envolvendo genes de citocinas foram realizados em algumas doenças como bronquite asmática (KNOW et al., 2008) e no lúpus eritematoso sistêmico (MI E ZENG, 2008). Na bronquite asmática o grau de desmetilação no gene *IL-4* foi alto em indivíduos sensíveis (KNOW et al., 2008), e no lúpus eritematoso foi observada uma hipometilação na região promotora de *IL-4* e *IL-6* em células T ativadas (MI E ZENG, 2008). A regulação epigenética, por uma hipometilação também pode estar envolvida na inflamação das vias respiratórias e na intolerância a endotoxinas bacterianas como lipopolissacarídeos (LPS) (ADCOCK et al., 2007).

A avaliação dos parâmetros de metilação em genes de citocinas é importante em desordens inflamatórias nas quais a expressão de citocinas é alterada. Mecanismos epigenéticos como metilação do DNA e acetilação de histonas são frequentemente associados com uma transcrição alterada dos genes, podendo ser relevantes na patogênese da DP (MI E ZENG, 2008).

Evidências iniciais apontam para uma hipometilação no gene *IL-6* em indivíduos com DP, comparados a controles, sugerindo um aumento da expressão dessa citocina em tecidos inflamados (OFFENBACHER; BARROS; BECK, 2008). A *IL-6* é uma citocina envolvida na reabsorção óssea, sendo encontrada em altos níveis em indivíduos com periodontite grave (MOREIRA et al., 2007).

Além disso, a presença de inflamação crônica e infecções bacterianas podem promover a metilação do DNA (VALINLUCK E SOWERS, 2007; BOBETSIS et al., 2007). O *stress* oxidativo e componentes halógenos produzidos por reações químicas durante o processo inflamatório persistente são capazes de alterar o padrão de metilação do DNA (VALINLUCK E SOWERS, 2007). O potencial de uma infecção microbiana provocar modificações epigenéticas na mucosa está sob investigação (BOBETSIS et al., 2007). Entretanto, não se sabe se alterações epigenéticas ocorrem devido a uma interação bacteriana direta com os tecidos ou como consequência a resposta inflamatória do hospedeiro (BOBETSIS et al., 2007).

O epigenoma, devido a sua plasticidade, também pode ser modificado por fatores como dieta, idade (ISSA, 2002; EDWARDS E MYERS, 2007), tabaco, álcool e toxinas. Estudos mostram a metilação do gene de *COL1A1*, responsável pela expressão da proteína colágeno α 1, no ligamento periodontal, durante o processo de envelhecimento (OHI et al., 2006).

Considerando as descobertas citadas anteriormente, fatores epigenéticos podem interferir na resposta do hospedeiro a infecção bacteriana e contribuir no fenótipo clínico da periodontite (OFFENBACHER; BARROS E BECK, 2008; GOMEZ; DUTRA; MOREIRA, 2009). Os mecanismos epigenéticos relacionados à doença periodontal ainda não foram estudados. Uma vez que os indivíduos não são igualmente suscetíveis aos efeitos destrutivos das infecções periodontais, está claro que a variabilidade na resposta do hospedeiro entre os indivíduos contribui significativamente para a expressão da periodontite na população (VAN DYKE E SHEILESH, 2005). Dessa forma, a avaliação da presença de metilação em genes de citocinas na doença periodontal poderá esclarecer importantes aspectos relacionados à resposta imune na DP.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Verificar a presença de metilação em genes de citocinas nos tecidos periodontais de indivíduos com gengivite e periodontite crônica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar e comparar a presença da metilação nos genes *IL-10* e *IFN- γ* em tecido gengival dos indivíduos com gengivite e periodontite crônica.

Associar a presença da metilação nos genes *IL-10* e *IFN- γ* com a gravidade da periodontite crônica.

4 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa deste trabalho foi submetido à apreciação e aprovação da Câmara do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Posteriormente, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG), 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 nº ETIC 337/08.

Todos os pacientes submetidos à triagem receberam tratamento odontológico indicado, independente de sua participação na pesquisa. Os pacientes e/ou responsáveis foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e forneceram o consentimento livre e esclarecido (Anexo A).

O presente estudo não levou riscos para os participantes do trabalho, visto que a curetagem da bolsa utilizada para coleta do material foi realizada durante o processo de raspagem subgengival que constitui um método de tratamento para esses pacientes. Além disso, todos os procedimentos foram realizados por pessoas devidamente habilitadas, seguindo as normas técnicas adequadas. A pesquisa atendeu aos preceitos éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, justiça e equidade. Quanto aos benefícios, este trabalho poderá contribuir para a elucidação dos fatores envolvidos no processo da doença periodontal.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os indivíduos foram triados na Clínica de Especialização em Periodontia e da Clínica de Graduação em Cirurgia, ambas da FO-UFMG. Foram incluídos 34 indivíduos adultos categorizados em dois grupos: gengivite e periodontite crônica, de acordo com a classificação da Academia Americana de Periodontia em 1999 (AAP).

No grupo gengivite, foram coletadas amostras de tecido gengival, em sítios com sinais clínicos de inflamação (sangramento a sondagem, edema, alteração de cor e forma), com profundidade de sondagem ≤ 3 mm, perda de inserção (PI) ≤ 3 mm e ausência de perda óssea comprovada radiograficamente. O material foi coletado de áreas adjacentes a dentes indicados para extração por motivo ortodôntico, exodontia de terceiros molares não inclusos ou em dentes com necessidade cirúrgica para recuperação do espaço biológico.

No grupo periodontite, foram coletadas amostras de tecido gengival de indivíduos com diagnóstico de periodontite crônica. As amostras foram provenientes de sítios com profundidade de sondagem ≥ 4 mm, PI ≥ 4 mm e presença de perda dos tecidos de suporte constatada radiograficamente. Os pacientes com PS ≤ 7 mm foram considerados com periodontite moderada e aqueles com PS > 7 mm, com periodontite grave. As amostras foram removidas durante processos cirúrgicos para a raspagem e alisamento radicular em “campo aberto”, com a finalidade de tratamento da DP. Anteriormente à cirurgia, esses indivíduos foram submetidos a terapia periodontal inicial constituída por profilaxia e raspagem e alisamento

radicular (RAR). No entanto, a cirurgia foi realizada naqueles sítios que não apresentaram melhora clínica, exibindo sangramento a sondagem e PS persistentes. A tabela 1 mostra as características dos grupos avaliados

Um questionário (Anexo B) foi aplicado a todos os indivíduos envolvidos neste estudo com objetivo de obter informações sobre a história dental, condições sistêmicas e hábitos considerados fatores de risco para a DP. O uso de aparelhos ortodônticos e de drogas antimicrobianas, anti-inflamatórias ou imunossupressoras, história de diabetes, hepatite ou infecção por HIV, presença de discrasias sanguíneas ou sistema imune comprometido, uso de tabaco e gravidez foram critérios de exclusão. Exceto pela presença da periodontite, os indivíduos incluídos neste trabalho eram sistemicamente saudáveis.

Tabela 1: Características clínicas dos grupos de estudo

FORMAS CLÍNICAS	GENGIVITE	PERIODONTITE CRÔNICA
N	16	18
IDADE	29,5 (19-	-
GÊNERO (M/F)	13: 5	12: 4
PS (sítio de coleta) (mm)	≤ 3	7 (4-
PI (sítio de coleta) (mm)	≤ 3	-

^a : mediana (min-máx)

PS: profundidade de sondagem, PI: perda de inserção

5.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA A ANÁLISE

A coleta das amostras realizada durante processos cirúrgicos citados anteriormente foi realizada com curetas estéreis e respeitando as normas de biossegurança. Após a coleta, a amostra foi dividida em dois fragmentos colocados em recipientes estéreis (criotubo de 2.0 ml) com *Tissue-teck*, e posteriormente armazenada a -80°C até o momento em que as amostras seriam utilizadas para a extração do DNA e confecção de cortes histológicos.

5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Cortes histológicos de $5\mu\text{m}$ das amostras congeladas foram confeccionados e corados com hematoxilina para uma avaliação histológica. Os cortes foram submetidos à contagem de células inflamatórias com um aumento de 400x, variando de 2 a 8 campos. Para a caracterização do infiltrado inflamatório nas amostras foi selecionado o campo com maior número de células inflamatórias.

5.4 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA do tecido gengival foi extraído através do QIAamp DNA Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA

obtido teve um volume final de 50µl diluído em água e foi estocado a -20°C. A concentração do DNA foi determinada por um espectrofotômetro.

5.5 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

Após a extração do DNA, as amostras foram tratadas com bissulfito de sódio, segundo a técnica de GOLDENBERG et al (2004). O tratamento com bissulfito de sódio converte todas as citosinas não metiladas em uracila, enquanto as citosinas metiladas não se modificam. O protocolo de tratamento do DNA com bissulfito de sódio encontra-se no anexo C.

5.6 METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO NO GENE *IFN-γ*

5.6.1 MSP-PCR (REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE METILAÇÃO ESPECÍFICA) DO GENE *IFN-γ*

Para analisar o estado de metilação do DNA da região promotora do gene *IFN-γ* foi utilizada a técnica MSP, conforme previamente realizado por Bonilla-Henao et al. (2005). Essa técnica distingue alelos metilados de não metilados em um dado gene, baseando-se na seqüência de mudanças induzidas pelo tratamento do DNA com o bissulfito de sódio (GOLDENBERG et al., 2004) e subsequente PCR (Reação

em Cadeia de Polimerase), utilizando *primers* específicos para DNA metilado e não-metilado.

A PCR consiste na amplificação *in vitro* de fragmentos específicos de DNA pela enzima DNA polimerase (SAKI et al., 1998). O protocolo padrão utilizado na maioria das amplificações de uma seqüência de DNA utiliza pares de oligonucleotídeos denominados *primers* (iniciadores), que delimitam o segmento de DNA a ser amplificado, funcionando como iniciadores da reação. Adiciona-se solução contendo desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), a enzima *Taq* DNA polimerase, tampão de incubação específico e o DNA genômico a ser amplificado. A amplificação pela PCR ocorre em termocicladores e consiste de ciclos repetidos de desnaturação, anelamento e extensão.

Para a realização do MSP do *IFN- γ* foram utilizados *primers* previamente descritos por Bonilla-Henao- et al. (2005) específicos para o DNA metilado e não metilado. Para a reação não-metilada o *primer* forward (F) foi: 5'- GTG ATA ATG GGT TTG TTT TAT T - 3' e o reverse (R) 5'- CCT AAT TAA AAT CTC CTA AAA ATT ACA TA - 3' gerando um produto de 183 pares de base (pb), e o para a reação metilada 5 - `GTG GGT ATA ATG GGT TTG TTT TAT C – 3' (F) e 5' - AAT TAA AAT CTC CTA AAA ATT ACG TA - 3' (R) gerando um produto de 180pb. Os CGs avaliados estavam localizados na região -186 e -54 da região promotora do *IFN- γ* . A reação de PCR foi feita com um volume final de 25 μ l, 2,5 μ l 10XPCR buffer, 5 μ l dNTP-mix (1mM de cada), 0,75 μ l magnésio (50mM), 0,5 μ l de cada *primer* (20pmol/ μ l), 0,5 μ l de *Taq Platinum* DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies, Calsbad, CA, USA) e 200 ng de DNA bissulfito-modificado. As condições de amplificação consistiram de 94⁰C por 4 min, seguidos de 30 ciclos de 94⁰C por 1 min, 48⁰C por 1 min e 72⁰C por 1 min, e uma extensão final de 7 min a 72⁰C. A

reação foi realizada no termociclador Eppendorf AG, Germany. Foram utilizados como controle positivo da reação metilada, DNA tratado com a enzima SssI metilase (New England Biolabs, Ipswich, Mass, USA), e para a reação não metilada, DNA de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) (KOWNG et al., 2005; BRAKENSIEK et al., 2005).

Para a visualização dos produtos da PCR foram utilizados géis de poliacrilamida 6,5%. Um volume de 5 μ l de cada produto juntamente com 3 μ l de gel loading buffer (GLB) foram aplicados a cada canaleta. A eletroforese foi realizada em tampão TBE 1x, a 180V, 200mA, durante aproximadamente 45 minutos, utilizando-se cuba específica (mini vertical gel electrophoresis unit, Sigma). Para a revelação, os géis foram submetidos a 150ml de solução fixadora (100ml de etanol, 5ml de ácido acético, 1000ml de água destilada) por 10 min., à solução de coloração (0,15g de nitrato de prata (AgNO₃), 50ml de solução fixadora e 100ml de água destilada) por 15 min., e após a lavagem em água destilada por 30s, à 150ml de solução reveladora (15g de NaOH, 3ml de formaldeído, 1000ml de água destilada) por 15 min.

5.7 METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO NO GENE IL-10

5.7.1-PCR, PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE *IL-10*

Para a análise do padrão de metilação da região promotora do gene *IL-10*, foi realizado inicialmente um PCR para amplificação do DNA modificado pelo bissulfito de sódio. Os seguintes *primers* foram utilizados: 5'- GGT AGG GGT TAT GGT GAG

TAT TAT TTG A - 3' (F) e 5' - CCT AAA CTA ACC CTC CAC CC AAT C - 3' (R), gerando um produto de 800 pb (SZALMÁS et al., 2008). Para a reação de PCR, foram incluídos 2,5µl de 10XPCR buffer, 5 µl dNTP-mix (1mM de cada), 0,75µl magnésio (50mM), 0,5µl de cada primer (20pmol/µl), 0,5µl de *Taq Platinum* DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies, Calsbad, CA, USA) e 200 ng de DNA, constituindo um volume final de 25µl. Neste caso as condições para amplificação consistiram de 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 30s e 72°C por 1 min, e uma extensão final de 10 min a 72°C. A reação foi realizada no termociclador (Eppendorf AG, Germany). Os produtos foram analisados em gel de acrilamida 6,5% corado pela prata., E em seguida esses produtos foram purificados pelo GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), segundo instruções do fabricante. A concentração do DNA foi determinada por um espectrofotômetro.

Posteriormente, os produtos de PCR purificados foram submetidos a reação de sequenciamento. Cada reação para sequenciamento constituiu de um volume final de 20µl , por adição de 2µl de Big Dye™, 3µl de tampão SAVE 5X, 1µl do primer (3,2pmol), e 400ng de produto de PCR. Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados de acordo com protocolo em anexo (Anexo D) e sequenciados no ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os CpGs analisados no gene da *IL-10* foram -634, -599, -373, -352, -350, -320, -185, -110.

5.8 ANÁLISE ESTÁTISTICA

A análise estatística dos dados foi realizada usando o programa BioEst 4.0 (Belém, Brasil). O teste χ^2 , teste exato de Fisher e o teste de Mann-Whitney, quando aplicáveis, foram utilizados para comparar a frequência do padrão de metilação entre os grupos gengivite e periodontite. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A mediana das células inflamatórias nos campos com maior quantidade de células no grupo gengivite foi 114, com variação de 34 a 287 células por campo. No grupo periodontite, a mediana foi 77, com variação de 11 a 400 células inflamatórias por campo. O teste de Mann-Whitney mostrou não haver diferenças estatisticamente significativas quanto ao número de células inflamatórias nos dois grupos. Em ambos os grupos o infiltrado inflamatório foi predominantemente mononuclear. Somente uma amostra no grupo gengivite foi caracterizada com infiltrado polimorfonuclear.

6.2 RESULTADOS DO MSP DO GENE *IFN- γ*

Na análise dos resultados do gene *IFN- γ* , a amplificação positiva somente para *primers* metilados foi interpretada como metilação total e a amplificação apenas para os *primers* não-metilados, como amostra não metilada. A amplificação positiva para ambos os *primers*, metilados e não metilados, foi considerada como metilação parcial, de acordo com Kwon et al. (2008).

Dados representativos dos resultados do gene *IFN- γ* estão ilustrados na figura (fig. 1). A maioria das amostras no grupo gengivite (100%) e no grupo periodontite (88,8%) apresentaram metilação para o gene *IFN- γ* (tabela 2). No grupo gengivite, apenas quatro foram positivas para metilação total do *IFN- γ* e doze amostras

mostraram metilação parcial do *IFN-γ*. Nenhuma amostra mostrou-se positiva apenas para os *primers* não metilados (U) (tabela 2). No grupo periodontite, seis amostras foram consideradas totalmente metiladas, dez foram parcialmente metiladas e apenas duas foram consideradas não metiladas (tabela 2).

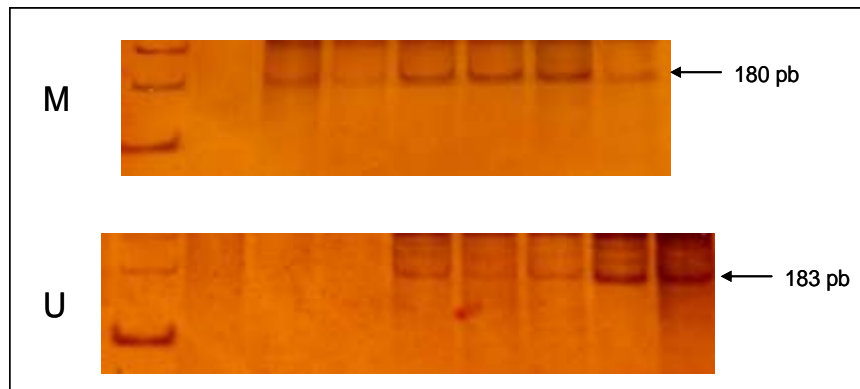


Figura 1: Representação dos géis de PCR para gene *IFN-γ*.

U- reações com *primers* não metilados

M - reações com *primers* metilados

Tabela 2: Resultados do MSP para o gene *IFN- γ*

Amostras	IFN- γ gene	
Gengivite	M	U
1	+	+
2	+	-
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	-
7	+	+
8	+	+
9	+	-
10	+	-
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
% de positivos	100%	75%
Periodontite		
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	-
5	+	-
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	+	-
11	-	+
12	+	+
13	+	-
14	+	-
15	+	+
16	-	+
17	+	+
18	+	-
% de positivos	88,88%	66,6%

Na análise da frequência do padrão de metilação entre os grupos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas com relação à frequência de totalmente metilados, parcialmente metilados e não metilados entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Frequência do padrão de metilação

GRUPOS	M+/U+	M+/U-	M-/U+
GENGIVITE	75%	25%	----
PERIODONTITE	55%	33,33%	11,11%

M+/U+: parcialmente metilados, M+/U-: totalmente metilados, M-/U+: não metilados

Em relação à gravidade da periodontite, não foi observada qualquer associação entre o padrão de metilação da região promotora do gene $IFN-\gamma$ e a gravidade da doença no grupo periodontite (fig.2).

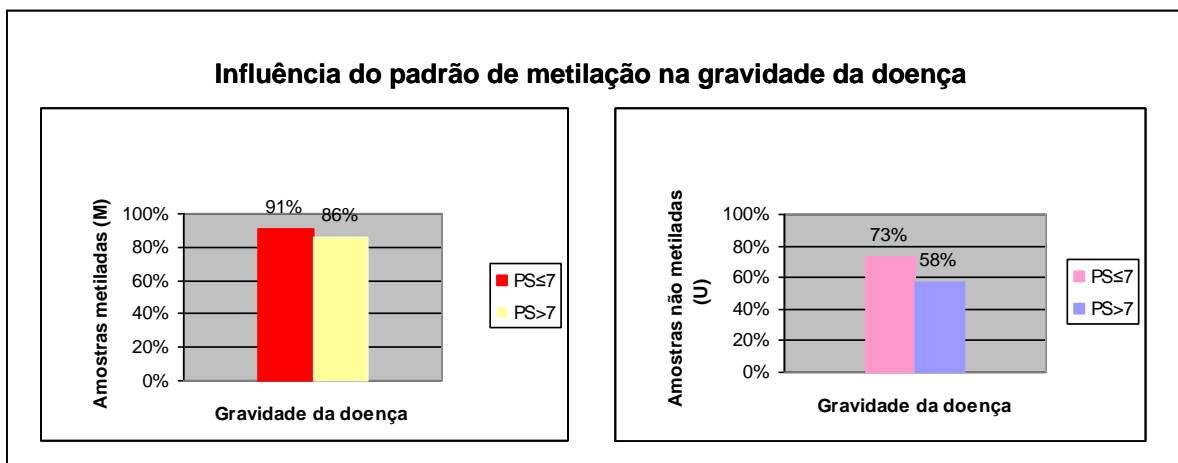


Figura 2: Padrão de metilação de $IFN-\gamma$ considerando a gravidade da periodontite crônica

6.3 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DO GENE *IL-10*

A análise do sequenciamento do gene *IL-10* foi realizada com os produtos de PCR de cada amostra (fig. 3), através dos eletroferogramas fornecidos pelo ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem, Foster City, CA). Neste gráfico, cada base é representada por uma cor e a leitura do gene pelo sequenciador proporciona picos para cada base identificada. Primeiramente, foi averiguada a conversão das citosinas não metiladas pelo tratamento das amostras com bissulfito de sódio. Em seguida, cada CpG foi analisado quanto ao padrão de metilação e classificado em não metilado quando apresentava no gráfico apenas o pico da Timina (T), em parcialmente metilado, quando foram reconhecidos os picos da Citosina (C) e da T simultaneamente e em totalmente metilado, quando apenas o pico da C foi verificado. A figura 4 mostra um eletroferograma representativo dos resultados obtidos.

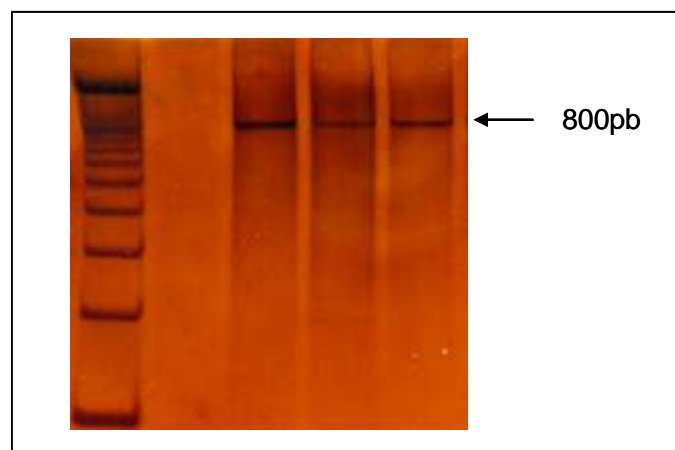


Figura 3: Representação do gel de PCR para o gene *IL-10*.

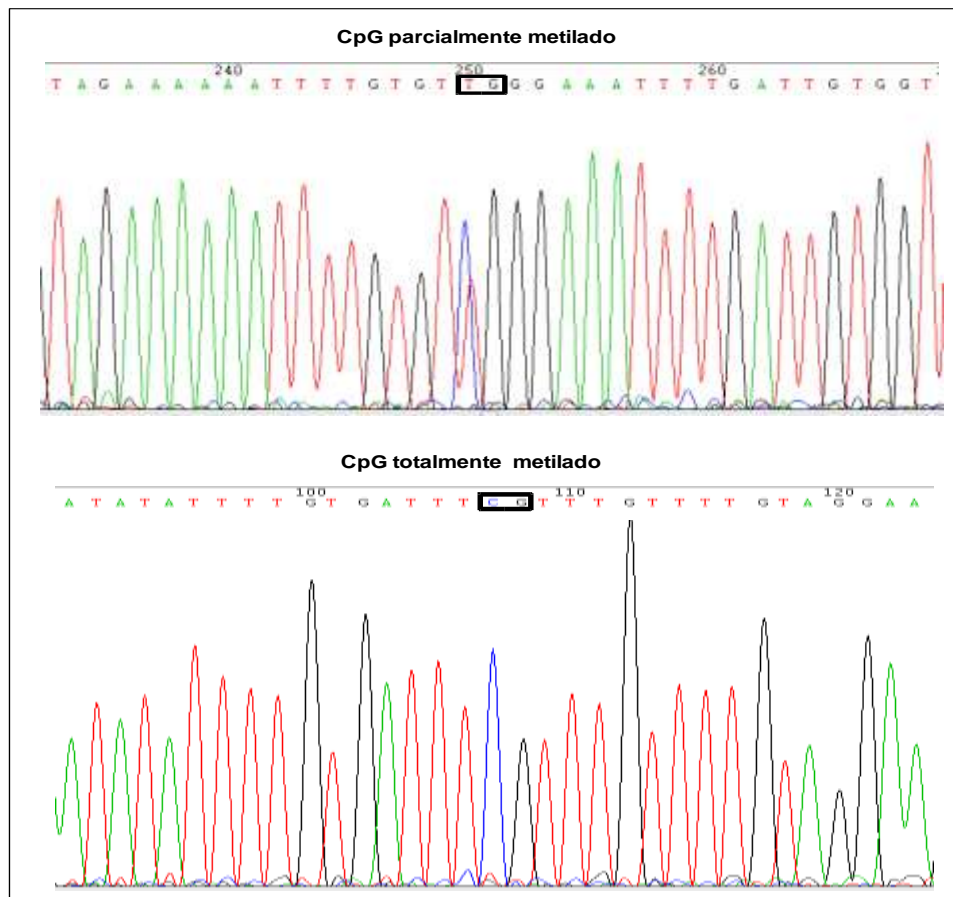


Figura 4: Eletroferograma representativo de CpG totalmente e parcialmente metilado. CpG -110 (parcialmente metilado) e CpG -599 (totalmente metilado)

Para o gene da *IL-10* foram avaliadas dez amostras, sendo seis do grupo gengivite e quatro do grupo periodontite. A figura 5 mostra os resultados obtidos no sequenciamento das amostras avaliadas. Foram observados CpGs totalmente e parcialmente metilados em ambos os grupos. Nenhum CpG não-metilado foi observado nas amostras consideradas. Não foi possível fazer a leitura dos CpGs -634 e -699 em duas amostras do grupo gengivite e do CpG -373 em uma amostra do grupo periodontite .

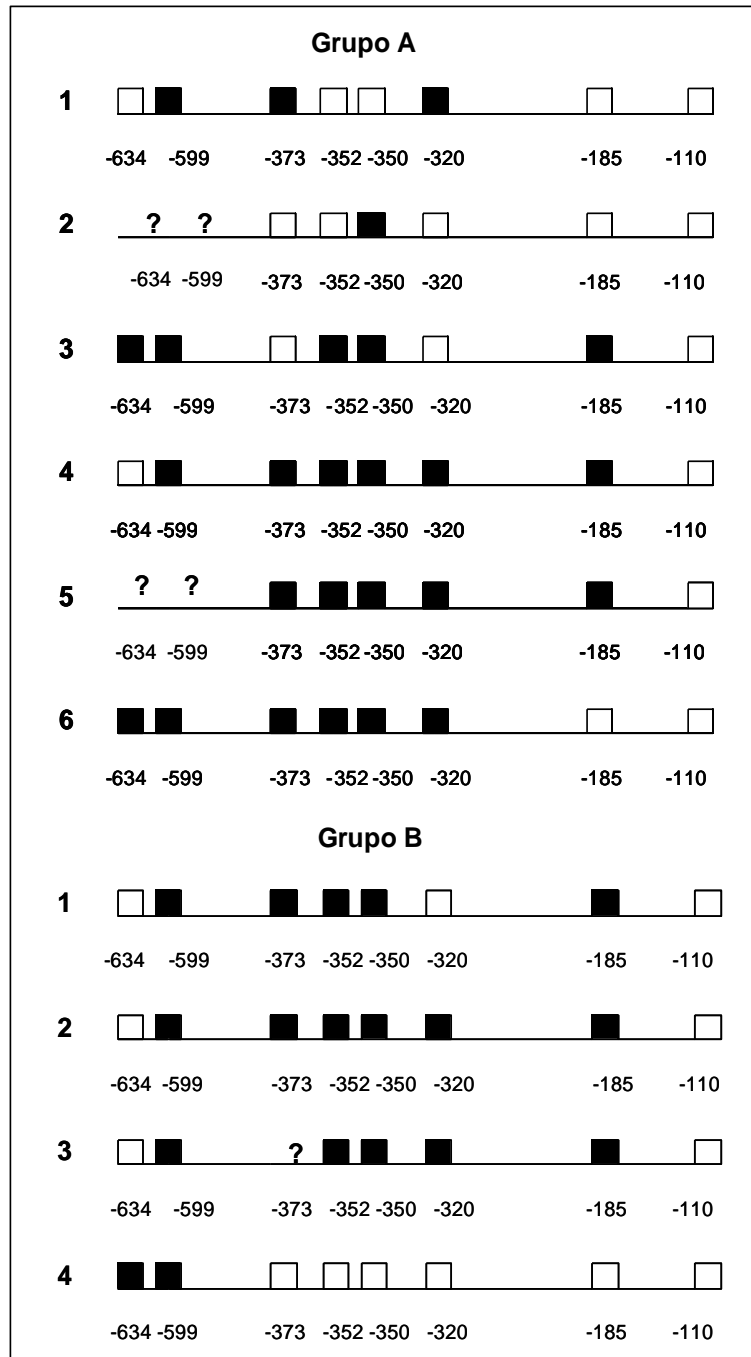


Figura 5: Padrão de metilação de 8 CpGs da região promotora do gene *IL-10* de amostras de indivíduos com gengivite (grupo A) e de indivíduos com periodontite (grupo B)

Totalmente metilados
 Parcialmente metilados
 (?) CpGs não sequenciados

Uma comparação entre as porcentagens das amostras totalmente metiladas no grupo gengivite e no grupo periodontite, para cada CpG, evidencia que 100% das amostras estavam totalmente metiladas no CpG -599. Na região dos CpGs -373 a -185, 50% ou mais das amostras apresentaram metilação total em ambos os grupos gengivite e periodontite. Para o CpG -634 uma menor porcentagem de amostras totalmente metiladas no grupo com periodontite foi observada quando comparado ao grupo com gengivite. O CpG -110 foi caracterizado como parcialmente metilado em todas amostras dos dois grupos (fig.6). Contudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos considerando cada CpG ($p>0.05$).

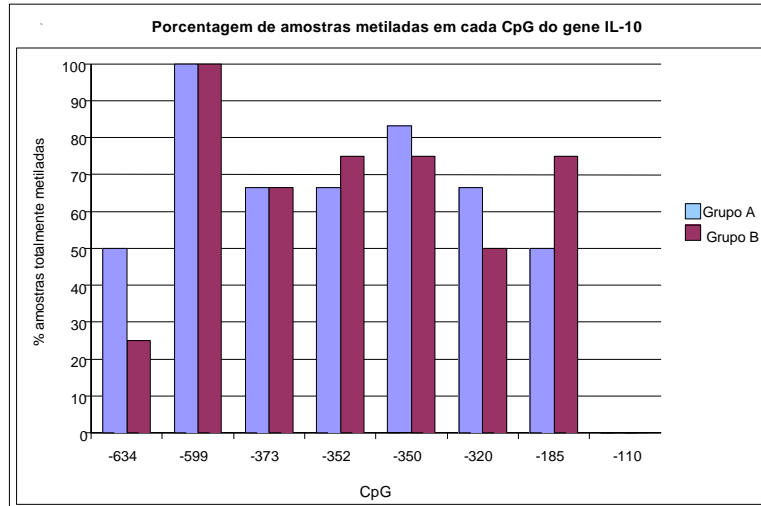


Figura 6: Porcentagem de amostras metiladas, por CpGs específicos nos grupos A (gengivite) e no grupo B (periodontite).

7 DISCUSSÃO

A doença periodontal, por ser considerada uma doença multifatorial, tem sido alvo de inúmeros estudos com o objetivo de esclarecer os fatores relacionados à sua patogênese. Apesar da presença de bactérias específicas ser necessária para o início e a progressão da doença, esta não é suficiente para causar a periodontite. Fatores do hospedeiro são igualmente ou mais importantes do que as bactérias na determinação do estabelecimento e do desenvolvimento da doença periodontal. Fatores de risco, próprios e adquiridos, como hábitos comportamentais e características transmitidas geneticamente, modificam a resposta do hospedeiro e determinam a suscetibilidade, início, progressão, gravidade e prognóstico da doença, em suas diversas expressões fenotípicas (PAGE et al., 1997; SALVI et al., 1998).

Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de identificar marcadores genéticos específicos que possam estar relacionados à doença periodontal, enfatizando a busca nos aspectos imunológicos do hospedeiro, principalmente em genes de citocinas. A descoberta por alterações epigenéticas nesses genes está em evidência (WHITE et al., 2002; ADCCOCK et al., 2007). O impacto de mecanismos epigenéticos em doenças inflamatórias cuja regulação é determinada pela expressão de citocinas tem sido demonstrado (BOBETSIS et al., 2005; WILSON, 2008).

A natureza da resposta inflamatória na DP é que determina suas características destrutivas. A interação entre produtos bacterianos e células de defesa induz a produção de citocinas e quimiocinas. A presença persistente de

bactérias leva à formação de um infiltrado inflamatório constituído principalmente por macrófagos e linfócitos (PAGE E SCHROEDER, 1990; GEMMEL; YAMAZAKI E SEYMOUR, 2002). A resposta inflamatória é característica de cada estágio da doença; dessa maneira, gengivite e periodontite possuem populações de células inflamatórias distintas quantitativa e qualitativamente (OKADA et al., 1983).

No presente estudo foi realizada a contagem do infiltrado inflamatório presente nas amostras de tecido gengival coletadas de indivíduos com gengivite e periodontite crônica. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os dois grupos avaliados. Pesquisas anteriores mostram uma diferença no número total de células inflamatórias entre gengivite e periodontite, sendo observado um aumento dessas células na periodontite (BATISTA et al., 2002). Tal contradição em relação aos nossos resultados pode ser devido aos indivíduos do grupo periodontite, por questões éticas, terem sido submetidos anteriormente à coleta, à terapia periodontal básica (AESCHIMANN et al., 1980; BATISTA et al., 2005). Uma vez realizada a remoção de parte do fator irritante, através da raspagem subgengival, há uma diminuição na inflamação e conseqüentemente na contagem das células do infiltrado. Os indivíduos do grupo gengivite foram tratados após a coleta. Quanto às características do infiltrado inflamatório, este foi predominantemente mononuclear nos dois grupos, o que está de acordo com observações prévias (BATISTA et al., 2002).

Um grupo controle com ausência de inflamação não foi incluído nesta pesquisa, devido a vários estudos demonstrarem uma inflamação histológica presente antes mesmo do acúmulo de placa resultar em sinais clínicos de inflamação (HONDA et al., 2006; YOUNES et al., 2009).

No presente estudo, foi avaliado o padrão de metilação nos CpGs -186 e -54 do gene *IFN- γ* em tecidos periodontais. Segundo Jones e Chen (2006), a metilação apenas do CpG -54 é suficiente para inibir a transcrição do *IFN- γ* em células Th1, sendo importante no controle da expressão pela metilação (WHITE et al., 2002; BONILLA-HENAO et al, 2005). Adicionalmente, tem sido sugerido que a não metilação do CpG -186 pode ter um forte efeito na expressão do gene (KNOW et al., 2008).

Tanto no grupo gengivite quanto no grupo periodontite foram observadas altas frequências de metilação, incluindo metilação total e parcial. Nossos resultados sugerem que a metilação do gene *IFN- γ* é um evento comum nos tecidos periodontais inflamados. Até o momento, não existem relatos na literatura sobre o padrão de metilação de *IFN- γ* nos tecidos periodontais inflamados. Entretanto, considerando a bronquite asmática, uma doença com perfil pró-inflamatório, Know et al. (2008) também verificaram que a maioria dos CpGs avaliados estavam metilados no gene *IFN- γ* .

Know et al. (2008) observaram que, após um estímulo específico, há um aumento na porcentagem de amostras não metiladas para o gene *IFN- γ* . No entanto, não foi encontrada uma correlação positiva entre a concentração da citocina *IFN- γ* e o aumento da porcentagem de sítios não metilados no gene. Por outro lado, Winders e colaboradores (2004) mostram um aumento na porcentagem de CpGs hipometilados em subgrupos de células T produtoras de *IFN- γ* . Em nosso trabalho, a presença de amostras não metiladas foi detectada apenas no grupo periodontite. Apesar da expressão do *IFN- γ* não ter sido verificada, está bem estabelecido que na doença periodontal células Th1 e suas citocinas são os principais mediadores da resposta inflamatória em lesões iniciais (GEMMEL E SEYMOUR, 2004). A diferença

na produção de IFN- γ entre gengivite e periodontite é pequena, havendo uma tendência para maior produção na periodontite (GARLET et al., 2003; GEMMEL E SEYMOUR, 2004). Essa diferença pode determinar a expressão dos diferentes tipos da doença periodontal, assim como sua atuação na patogênese da doença pode variar de indivíduo para indivíduo e em um mesmo indivíduo ao longo do tempo (HONDA et al., 2006).

Ao contrário do esperado, foi observada no presente estudo uma alta frequência de metilação de *IFN- γ* em ambos os grupos, sugerindo que a metilação dos CpG avaliados é um evento comum e que outros mecanismos estejam envolvidos na expressão dessa citocina. O controle da metilação sobre o silenciamento transcricional do gene depende do número de citocinas metiladas nas ilhas de CpG e da sua posição dentro da seqüência do gene (KNOW et al., 2008; WINDERS; SCHAWARTZ E BRUNIQUEL, 2004; BONILLA-HENAO et al., 2005). Uma vez que só analisamos dois CpGs dentro da seqüência do *IFN- γ* , a avaliação de outros CpG envolvidos na transcrição gênica e sua correlação com a expressão de IFN- γ nessas amostras pode ser relevante.

Na doença periodontal, muitos tipos celulares estão envolvidos na resposta à infecção bacteriana. De acordo com Tato et al (2004), em uma população celular mista, com células em diferentes estágios de ativação, podemos observar células metiladas e não metiladas. A presença de metilação parcial do gene IFN- γ , evidenciada em doze amostras do grupo gengivite e em dez amostras do grupo periodontite pode ser esclarecida pela possível presença de diferentes tipos celulares nos tecidos periodontais, podendo em uma mesma amostra de tecido, ser verificadas células metiladas e não metiladas.

De forma similar à ausência de diferenças na frequência do padrão de metilação entre os grupos também não foi observada diferença relacionada à gravidade da doença. Em conjunto, nossos dados sugerem que as alterações no padrão de metilação não estão envolvidas com o estabelecimento e o desenvolvimento da doença periodontal. Embora evidências sugiram que a presença de inflamação possa interferir na metilação do DNA (STENVINKEL et al., 2007; VALINLUCK E SOWERS, 2007), a metilação do gene *IFN- γ* parece ser um padrão normal em tecidos periodontais inflamados.

Em relação ao gene *IL-10*, foi avaliado o padrão de metilação de oito CpGs, localizados nas posições -634, -599, -373, -352, -350, -320, -185, -110 (SZALMÁS et al., 2008). De um modo geral, foi constatada uma alta frequência de metilação nos CpGs avaliados na região promotora em todas as amostras.

Em relação ao CpG -110, foi observada uma metilação parcial em todas as amostras nos dois grupos. A presença de metilação parcial pode ser explicada pelos diferentes tipos celulares encontrados nas amostras, em diferentes estágios de ativação. Estudos prévios de *IL-10* demonstraram uma alta frequência de metilação total do CpG -110 em queratinócitos, e ausência de metilação em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) (SZALMÁS, et al., 2008). Szalmas et al. (2008) notaram que a expressão de *IL-10* está associada principalmente ao padrão de metilação observado no CpG localizado na posição -110, uma vez que essa região está associada à ligação de um importante fator de transcrição, STAT3. A ausência de metilação dessa região é observada em células produtoras de *IL-10*, enquanto a presença de metilação está associada ao silenciamento do gene em questão (SZALMÁS, et al., 2008).

No CpG localizado na posição -185, uma tendência a metilação total foi observada, embora uma metilação parcial também tenha sido encontrada em algumas amostras. O mesmo padrão de metilação foi observado por Szalmás et al. (2008) em queratinócitos. As alterações de metilação desses dois CpGs mais proximais na região promotora do gene *IL-10* podem determinar o silenciamento transcricional desse gene em diferentes tipos celulares (SZALMÁS et al., 2008).

Considerando os CpGs mais distais do gene *IL-10*, Szálmas et al. (2008) relataram que o alto nível de metilação nessas regiões parece não interferir na produção da citocina. Uma alta frequência de metilação total foi observada nos CpGs -599, -373, -352, -350 e -320 em ambos os grupos, sugerindo que a metilação dessas regiões é um evento comum nos tecidos periodontais inflamados. Já no CpG -634, foram observadas amostras totalmente metiladas e parcialmente metiladas em ambos os grupos, existindo uma menor porcentagem de amostras totalmente metiladas no grupo periodontite. Contudo, dados sobre a expressão de *IL-10* em nossas amostras são necessários para que se possa verificar a relação entre a ocorrência de metilação total/parcial e a expressão da citocina.

Dados da literatura sobre a importância na expressão de um gene em relação à porcentagem total de sítios metilados *versus* a metilação de um sítio específico são controversos (Know et al., 2007). Diversamente de Szálmas et al. (2008), Dong et al. (2007) encontraram poucas diferenças no padrão de metilação da região promotora do gene *IL-10* quando comparadas células Th produtoras ou não de *IL-10*. Baseado nesses dados, torna-se relevante avaliar a expressão de *IL-10* e correlacioná-la com o padrão de metilação observado nas amostras.

Embora ainda existam controvérsias na literatura, a participação crucial das citocinas *IFN- γ* e *IL-10* no desenvolvimento da doença periodontal é inquestionável.

Apesar de avaliarmos o padrão de metilação nos genes que expressam essas citocinas e não termos encontrado associações significativas, é importante ressaltar que outros fatores podem estar envolvidos na regulação da transcrição, como polimorfismos genéticos (MOREIRA et al., 2007), a ausência de fatores de transcrição (DONG, et al., 2007) e outros. Além disso, uma variedade de genes está envolvida no complexo mecanismo da patogênese das doenças periodontais e o estudo da metilação nesses genes pode ser esclarecedor, bem como o estudo da expressão das moléculas codificadas por eles.

Ao longo da vida, os indivíduos são expostos a fatores que podem influenciar o epigenoma e alterar a resposta à presença bacteriana. Mecanismos genéticos, já associados à doença periodontal, e epigenéticos não são mutuamente exclusivos, mas atuam concomitantemente na regulação da expressão do gene. Assim, acreditamos que o estudo sobre fatores epigenéticos pode ser importante no entendimento das variações nas respostas inflamatórias entre diferentes indivíduos, contribuindo para esclarecer mecanismos na patogênese da doença periodontal.

8 CONCLUSÃO

A metilação do gene *IFN- γ* e *IL-10* pode ser considerada um evento comum nos tecidos periodontais inflamados. Considerando que a metilação é um importante mecanismo no controle da expressão de genes de citocinas e devido a importância dessas moléculas no processo imunoinflamatório da doença periodontal, estudos adicionais são necessários para investigar a atuação de alterações epigenéticas nesses tecidos.

9 REFERÊNCIAS

AAP (*The American Academy of Periodontology*). International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*, v.4, n.1, dec. 1999.

ADOCK, I. A.; TSAPROUNI, L.; BHAVSAR, P.; ITO, K. Epigenetic regulation of airway inflammation. *Curr Opin Immunol*, v.19, n.6, p. 694-700, aug. 2007.

AESCHLIMANN, C.R.; KAMINSKI, E.J.; ROBINSON, P.J. The effects of periodontal therapy on the mast cell population in gingival tissues. *J periodontol*, v.51, n.4, p.193-198, abr. 1980.

ALBANDAR, J.M.; TINOCO E.M.B. Global epidemiology of periodontal disease in children and young persons. *Periodontol 2000*, v.29, p.153-176, apr. 2002.

ALISSON, J.P.; LANIER, L.L. Structure, function, and serology of the T- cell antigen receptor complex. *Annu Rev Immunol*, v.5, p. 503-540, 1987

ALPAGOT, T.; FONT, K.; LEE, A. Longitudinal evaluation of GCF IFN- gamma levels and periodontal status in HIV+ patients. *Journal Clin Periodontol*, v.30, n.11, p. 944-948, nov. 2003.

ARMENANTE, F.; MEROLA, M.; FURIA, A.; PALMIERE, M. Repression of the IL-6 gene is associated with methylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 258, n.3, p.644-647, may 1999.

ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal disease and conditional. *Ann Periodontol*, Chicago, v. 4, n. 1, p.16, dec. 1999.

BABEL, N.; CHEREPNEV, G.; BABEL, D.; TROPMANN, A.; HAMMER, M.; VOLK, H.D; REINKE, P. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, v.77, n.12, p. 1978-83, dec. 2006.

BÄCKDAHL, L.; BUSHELL, A.; BECK, S; Inflammatory signaling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. *Int J Biochen Cell Biol*, v. 41, n. 1, p. 176-184, jan. 2009.

BAYLIN, S.B. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, v.2, supl.1, p 4-11, dec. 2005.

BATISTA, A.C., SILVA, T.A., CHUM, J. H., LARA, V.S. Nitric oxide syntese and severity of human periodontal disease. *Periodontal disease: Pathogenesis*, v. 8, p. 254-260, Bauru, may 2002.

BOBETSIS, Y.A.; BARROS, S.P.; LIN, D.M.; WEIDMAN, J.R.; DOLINOY, D.C; JIRTLE, R.L.; BOGGESS, K.A.; BECK, J.D; OFFENBACHER, S. Bacterial infection promotes DNA hipermethylation. *J Dent Res* , v.86, n. 2, p. 169-174, feb. 2007.

BONILLA-HENAO, V., MARTÍNEZ, R.; SOBRINO, F.; PINTADO, E. Different signaling pathways inhibit DNA methylation activity and up-regulate IFN- γ in human lymphocytes. *J Leukoc Biol*, v. 78, n.6, p. 1339-1346, dec. 2005.

BORREL, L.N.; PAPAPANOU, P.N. Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 32, suppl. 6, p. 132-158, aug. 2007.

BRAKENSIEK, K.; LÄNGER, F.; KREIPE, H.; LEHMANN, U. Absence of p21 (CIP1), p27 (KIP 1) and p57 (KIP 2) methylation in MDS and AML. *Leuk Res*, v. 29, n. 11, p. 1357-1360, nov. 2005.

BURZYNSKI, M; DURIAGIN, S.; MOSTOWSKA, M.; WUDARSKI, M.; CHWALINSKA-SADOWSKA, H.; JAGODZINZKI, P.P. MTR 2756 A>G polymorphism is associated with the risk of systemic lupus erythematosus in the Polish population. *Lupus*, v.16, n. 6, p 450-454, 2007.

CALIFANO, J.V. Position paper: periodontal disease of children and adolescents. *J Periodontol*, v.74, n.11, p. 1696-1704, nov. 2003.

DE WAAL MALEFYT, R.; YSSEL, H.; RONCAROLO, M.G.; SPITS, H.; DE VRIES, J.E. Interleukim 10. *Curr Opin Immunol*, v.4, p.314-320, 1992.

EDWARDS, T.M.; MYERS, J.P. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. *Environ Health Perspect*, v.115, n. 9, p. 1264-1270, sep. 2007.

EGGER, G.; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P. A.; Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, v. 429, n. 6990, p. 457-463, may. 2004.

FITZPATRICK, D.R.; WILSON, C.B. Methylation and demethylation in regulation of genes, cells, and responses in the immune system. *Clin Immunol*, v.109, n.1, p. 37-45, oct. 2003.

FITZPATRICK, D.R.; SHIRLEY, K.M.; MCDONALD, L.E.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; KAY, G.F.; KELSO, A. Distinct methylation of the interferon-gamma (IFN-gamma) and interleukin 3 (IL-3) genes in newly activated primary CD8+ T lymphocytes: regional IFN-gamma promoter demethylation and m RNA expression are heritable in CD44(high)CD8+ T cells. *J Exp Med*, v. 188, n.1, p. 103-117, jul. 1998.

FU, L.H.; CONG, B.; ZHEN, Y.F.; LI, S.J.; MA, C.L.; NI, Z.Y.; ZHANG, G.Z.; ZUO, M.; YAO, Y.X. Methylation status of the IL-10 gene promoter in the peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *Yi Chuan*, v.29, n. 11, p. 1357-1361, nov. 2007.

GALM, O.; YOSHIKAWA, H.; ESTELLER, M.; OSIEKA, R.; HERMAN, J.G. SOCS-1 a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in myeloma. *Blood*, v. 101, n.7, p.2784-2788, apr. 2003.

GAFFAR, A.; VOLPE, A. R. Inflammation, periodontal diseases, and systemic health. *Comp Contin Educ Dent*, v.25, n.7, supp.11, p. 4-6, jul. 2004.

GARLET, G.P.; JR, W.M.; FERREIRA, B.R.; MILANEZI, C.M.; SILVA, J.S. Patterns of chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontol Res*, v.38, n.2, p. 210-217, apr. 2003.

GEMMEL, E.; SEYMOUR, G.J. Immunoregulatory control of Th1 and Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000*, v.35, n.1, p. 21-41, jun. 2004.

GEMMELL, E.; YAMAZAKI, K.; SEYMOUR, G.J. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of lymphocytic response. *Crit Rev Oral boil Med*, v.13, n.1, p. 17-34, 2002.

GOLDENBERG, D.; HARDEN, S.; MASAYESVA, B.G.; HÁ, P.; BENOIT, N.; WESTRA, W.H.; KOCH, W.M.; SIDRANSKY, D.; CALIFANO, J.A. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 130, n.1, p.39-44, jan. 2004.

GOMEZ, R.S.; DUTRA, W.O.; MOREIRA, P.R. Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. *Inflamm Res*, v.58, n.10, p.625-629, may. 2009.

GOPISETTY, G.; RAMACHANDRAN, K.; SINGAL, R. DNA methylation and apoptosis. *Mol Immunol*, v.43, n. 11, p.1729-1740, feb. 2006.

GÓRSKA, R.; GREGOREK, H.; KOWALSKI, J.; LASKUS-PERENDYK, A., SYCZEWSKA, M.; MADALÍNSKI, K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 30, p. 1046-1052, mar. 2003.

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, v.79, n. 8 suppl., p. 1585-1591, aug. 2008.

GRENIER, D.; MAYRAND, D. Periodontosis na ecological imbalance. In: KURAMITSU, H.K.; ELLEN, R.P. Oral bacterial ecology the molecular basis. Horizon Scientific, cap. 6, p. 275-310, 2000.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, v. 5, n.1, p. 78-111, jun. 1994.

HONDA, T.; DOMOM, H.; OKUI, T.; KAJITA, K.; AMANUMA, R.; YAMAZAKI, K.; Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol*, v. 144, n.1, p. 35-40, apr. 2006.

ISHIKAWA, I. Host responses in periodontal disease: a preview. *Periodontol 2000*, v. 43, p. 9-13, 2007.

ISSA, J.P. Epigenetic variation and human disease. *J Nutr*, v. 138, suppl. 8, 2388-2392, aug. 2002.

JOHNSON, I.T.; BELSHAW, N.J. Enviroment, diet and CpG island mathylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. *Food Chen Toxicol*, v. 46, n.4, p. 1346-1359, apr. 2008.

JONES, B.; CHEN, J. Inhibition of IFN- γ transcription by site-specific methylation during T helper cell development. *Embo J*, v.25, n. 11, p. 2443-2452, jun. 2006.

KINANE, D.F.; HART, T.C. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 14, n. 6, p. 430-449, 2003.

KINANE, D.F.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Interações entre parasita e hospedeiro na doença periodontal. In: LINDHE, Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral. 3 ed., Guanabara-Koogan, cap. 5, p. 148-175, 2005.

KINANE, D.F.; LINDHE, J. Patogênese da periodontite. In: LINDHE, Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. TO, ed., Guanabara - Koogan, cap. 5, p.127-152, 1999.

KINANE, D.F.; HODGE, P.; ELLIS, R.; GALLAGHER, G. Analysis of genetic polymorphism at the interleukin-10 and tumor necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodontol Res*, v.34, n. 7, p. 379-386, oct. 1999.

KNOW, N.H.; KIM, J.S.; LEE J.Y.; OH, M.J.; CHOI, D.C. DNA methylation and expression of IL-4 and IFN- γ promoter genes in patients with bronchial asthma. *J Clin Immunol*, v. 28, n.2, p.139-146, mar. 2008.

KWONG, J.; LO, K.W.; CHOW, L.S.; CHAN, F.L.; TO, K.F.; HUANG, D.P. Silencing of the retinoid response gene TIG1 by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, v. 113, n. 3, p. 386-392, jan. 2005.

LI, L.C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing *primers* for methylation PCRs. *Bioinformatics*, v.18, n.11, p. 1427-1431, nov. 2002.

LINDHE, J.; OKAMOTO, H.; YONEYAMA, T.; HAFFAJEE, A.; SOCRANSKY S.S. Longitudinal changes in periodontal disease in untreated subjects. *J Clin Periodontol*, v.16, n.10, p.662-670, nov. 1989.

MADIANOS, P.N; BOBETIS, Y.A; KINANE, D.F. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol*, v.32, Suppl. 6, p. 57-71, 2005.

MARQUES, A.H.; CIZZA, G.; STENBERG, E. Interações imunocerebrais e implicações nos transtornos psiquiátricos. Rev. Bras. Psiquiatr. São Paulo 2007. Disponível em:<[http:// www.scielo.br/scielo.php? Script = sci_artex & pid = s1516-44462007000500006](http://www.scielo.br/scielo.php?Script=sci_artex&pid=s1516-44462007000500006) & IMG= pt & nmr= ISSO>. Acesso em: 24 set 2007.

MARTINS, P.H.F. Mecanismos patogênicos na doença periodontal: aspectos imunológicos. Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia da UFMG, 1997.

MI, X.B.; ZENG, F. Hypomethylation of interleukina-4 and promoter in T cells from systeic lupus erytematosus. *Acta Pharmacol Sin*, v.29, n.1, p. 105-112, jan. 2008.

MINER, K.T.; CROFT, M. Generation, persistence and modulation of Th0 effectors cells: role of autocrine IL-4 and IFN-gamma. *J immunol*, v. 160, n 11, p. 5280-5287, jun. 1999.

MOORE, W.E.C.; MOORE, L.V.H. The bacteria of periodontal disease. *Periodontol 2000*, v.5, p. 66-77, jun. 1994.

MOREIRA, P.R; LIMA, P.M; SATHLER, K.O; IMANISHI, S.A; COSTA, J.E; GOMES, R.S; GOLLOB, K.J; DUTRA, W.O. Interleukin-6 expression and gene polymorphisms are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian. *Clin Expt Immunol*, v. 148, n.1, p. 119-126, apr. 2007.

MOREIRA, P.R.; DE SÁ, A.R.; XAVIER, G.M.; COSTA, J.E.; GOMEZ, R.S.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Braziliam individuals. *J Periodontal Res*, v. 40, n.4, p. 306-311, aug. 2005.

MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T- cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, v.17, n.3, p. 138-146, mar. 1996.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol*, v. 46, p. 111-147, 1989.

OFFENBACHER, S.; BARROS, P.S.; BECK, J.D. Rethinking periodontal inflammation. *J Periodontol*, v.79, n.8 suppl., p.1577-1584, aug. 2008.

OFFENBACHER, S. Periodontal disease: pathogenesis. *Ann Periodontol*, v. 1, n. 1, p. 821-878, nov, 1996.

OHI, T.; UEHARA, Y.; TAKATSU, M.; WATANABE, M.; ONO, T. Hypermethylation of CpG in the promoter of COL1A1 gene in the aged periodontal ligament. *J Dent Res*, v.85, n.3, p. 245-250, oct. 2005.

PAGE, R.C. Advances in the pathogenesis of periodontitis; summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*, v.14, n.1, p. 216-248, jun. 1997.

PAGE, R.C.; SCHROEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation*, v.34, n.3, p. 235-249, mar. 1976.

RICHARDSON, B. DNA methylation and auto immune disease. *Clinical Immunology*. V.109, n.1, p.72-79, oct. 2003.

ROBERTS, F.A.; McCAFFERY, K.A.; MICHALEK, S.M.; Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J. Dental Res.*, V.76, n.12, p.1833-1839, dec. 1997.

SALVI, G.E.; BROWN,C.E.; FUJIHASHI, K.; KIYONO, H.; SMITH, F.W.; BECK, J.D.; OFFEMBACHER, S. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult an early onset periodontitis. *J Periodontol Res.*, v.33, n.4, p. 212-225, may. 1998.

SANDERS, V.M. Epigenetics regulation of Th1 and Th2 cell developmente. *Brain Behavior and Immunit*, v.20, n.4, p. 317-324, jul. 2006.

SARAIVA, M.; COUSINS, D.J.; WINKELMANN, N.E.; STAYNOV, D.Z. Identification of a macrofaphage-specific choramatin signature in the IL-10 locus. *J Immunol*, v.175, n. 2, p.1041-1046, jul. 2005.

SCHENKEIN, H.A. Host responses in maintaining periodontal health and determing periodontal disease. *Periodontol 2000*, v. 40, n.1, p. 77-93, feb. 2006.

STENVINKEL, P.; KARIMI, M.; JOHANSSON, S.; AXELSSON, J.; SULIMAN, M.; LINDHOLM, B.; HEIMBÜRGER, O.; BARANY, P.; ALVESTRAND, A.; NORDFORS, L.; QURESHI, A.R.; EKSTRÖM, T.J.; SCHALLING, M. Impact of inflammation on epigenectic DNA methylation: a novel risk factor for cardiovascular disease? *J Intern Med*, v. 261, n. 5, p. 488-499, may. 2007.

SULLIVAN, K. E.; REDDY, A. B. M.; DIETZMANN, K.; SURIANO, A.R.; KOCIEDA, V.P.; STEWART, M. Epigenetic regulation of tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol*, v.27, n. 14, p. 5517-5560, jul. 2007

SUSIN C.; KIGMAN A.; ALBANDAR J.M. Effect of partial recording protocols on estimates of prevalence of periodontal disease. *J Periodontol*, V.76, n.2, P. 262-267, feb. 2005.

SZALMÁS, A.; BÁNÁTI, F.; KOROKNAI, A.; LÁSZLÓ, B.; FEHÉR, E.; SALAMON, D.; GERGELY, L. MIRÁNOVITS, J.; KÓNYA, J. Lineage-specific silencing of human IL-10 expression by promoter methylation in cervical cancer cells. *Eur J Cancer*, v.44, n.7, p. 1030-1038, may. 2008.

TEDDER, T.F.; STEEBER, D.A.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J*, v.9, n. 10, p. 866-873, jul. 1995.

TERNOVEN, T.; RAUNIO, T.; KNUUTTILA, M.; KARTTUN, R. Polymorphisms in the CD-4 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v. 34, n. 5, p. 377-383, may. 2007.

TSAI, C.C.; KU, C.H.; HO, Y.P.; HO, K.Y.; WU, Y.M.; HUNG, C.C. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon- gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial Therapy. *Kaohsiung J Méd Sci*, v. 23, n. 1, p. 1-7, jan. 2007.

UKAI, T.; MORI, Y.; ONOYAMA, M.; HARA, Y. Immunohistological study of interferon-gamma and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingival. *Arch Oral Biol*, v.46, n. 10, p. 901-908, oct. 2001.

WILSON, A. G.; Epigenetic regulation in the inflammatory response and relevance to common diseases. *J Periodontol*, v.79, n.8 (suppl.), p.1514-1519, aug. 2008.

WINDERS, B.R.; SCHWARTZ, R.H.; BRUNIQUEL, D. A distinct region of the murine IFN- promoter is hypomethylated from early T cell development through mature naïve and Th1 cell differentiation, but is hypermethylated in Th2 cells. *J Immunol*, v.173, p.7377-7384, oct. 2004.

WHITE, G. P.; WATT, P.M.; HOLT, B. J.; HOLT, P.G. Differential patterns of methylation of the IFN- γ promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN- γ gene expression between human neonatal and adult CD45RO-T cells. *J Immunol*, v. 168, n.6, p.2820-2827, mar. 2002.

YAMAZAKI, K.; NAKAJIMA, T.; AOYAGI, T.; HARA, K. Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in periodontal disease. *J Periodontol Res*, v. 28, n. 5, p. 324-334, sep. 2001.

YANO, S.; PARITOSH, G.; HITOSHI, K.; MEREDITH, B.; LONGO, D.L. Effect of promoter methylation on the regulation of IFN- γ gene during in vitro differentiation of human peripheral blood T cells into a Th2 population. *J Immunol*, v. 171, n.5, p. 2510-2516, sep. 2003.

YONG, H.A.; GHOSH, P.; YE, J.; LEDERER, J.; LICHTMAN, A.; GERARD, J.R.; PENIX, L.; WILSON, C.B.; MELVIN, A.J.; MCGURN, M. E.; et al. Differentiation of T helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN- gamma gene. *J Immunol*, v. 153, n. 8, p. 3603-3610, oct. 1994.

YOSHIKAWA, H.; MATSUBARA, K.; QUIAN, G. S.; JACKSON, P.; GROOPMAN, J. D.; MANNING, J. E.; HARRIS, C.C.; HERMAN, J. G. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nature genetics*, v.28, p.29-35, may. 2001.

YOUNES, R.; GHORRA, C.; KHALIFE, S.; IGONDJO-TCHEN-CHANGOTADE, S.; YOUSFI, M.; WILLIG, C.; SENNI, K.; GODEAU, G.; NAAMAN, N. Pertinent cell population to characterize periodontal disease. *Tissue and Cell*, v. 41, n.2, p.140-150, apr. 2009.

VALINLUCK, V.; SOWERS, L.C.; Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNTMT1. *Cancer Res*, v.67, n. 3, p. 946-950, feb. 2007.

VAN-DYKE, T.E.; SHEILESH, D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol* v.7, n.1, p.3-7, jan. 2005.

ANEXOS

ANEXO A

TERMO DE ESCLARECIMENTO

A doença periodontal é uma doença que acomete dentes, gengiva e osso, gerando uma inflamação da gengiva, sangramento e perda progressiva do osso em volta dos dentes. Esta pesquisa está sendo realizada para identificar possíveis ocorrências de alterações genéticas em pacientes que apresentam doença periodontal, para isso será necessário coletar uma amostra (uma pequena parte de tecido da gengiva) removida durante cirurgia que já fará parte do seu tratamento periodontal. Os tecidos coletados, após a análise, servirão para comparar amostras de pacientes sem doença periodontal com amostras de pacientes com doença periodontal. Este documento tem por finalidade propor a sua participação neste projeto de pesquisa. A sua participação nesta pesquisa não irá interferir de maneira alguma na execução dos procedimentos do tratamento indicado. Os dados obtidos serão utilizados na dissertação de mestrado da cirurgiã-dentista Michelle Beatriz Viana, pelo Programa de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a coleta e a utilização da amostra neste projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

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

LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / _____ .

NOME DO PACIENTE

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ No. _____

Pesquisadora: **Michelle Beatriz Viana**. Telefone: 91986065

Pesquisador responsável: **José Eustáquio da Costa**

Telefone: 34092470/ 34092412

COEP: Av, presidente Antônio Carlos, 6627 - Unidade administrativa II

Sala 205 - Cep: 31270-901- BH- MG

Telefax: (031) 34094592 - email: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO B**FICHA CLÍNICA****Pesquisa para dissertação de mestrado****Aluna: Michelle Beatriz Viana****Orientador: Prof. Dr. José Eustáquio da Costa****Coorientadora: Dra. Paula Rocha Moreira****DATA DO EXAME RADIOGRÁFICO:** _____**DATA DA COLETA** _____**IDENTIFICAÇÃO**

Nome: _____

Sexo: _____ Cor: _____ Profissão: _____

Data de nasc: ____ / ____ / ____

Naturalidade: _____

Est. Civil: _____

Endereço: _____

CEP: _____ Cidade: _____

UF: _____ Telefones: _____

ANAMNESE

QP: _____

HDA: _____

Está sob tratamento médico? Sim () Não ()

Está fazendo uso de algum medicamento? Sim () Não ()

Tem algum tipo de alergia? Sim () Não ()

Apresenta alguma das seguintes condições:

- () diabetes / distúrbios endócrinos;
- () hemorragias/doenças hematológicas;
- () cardiopatias;
- () hepatite;
- () hipertensão arterial;
- () doenças renais;
- () doenças respiratórias;
- () doenças gastrointestinais;
- () outros.

Observações:

Hábitos:

Exame radiográfico _____

ANEXO C

TRATAMENTO DO DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO

Desnaturação do DNA

1. Pipetar 0.5 μ l de DNA em eppendorf de 2.0ml..
2. Completar com água MilliQ autoclavada para 17ml.
3. Adicionar 1 μ l de DNA de esperma de salmão. (Ci=10mg/ml).
4. Adicionar 2 μ g de NaOH 3M.
5. Vortexar e dar spin.
6. Aquecer por 20 minutos a 5^o C em banho seco ou úmido.

Tratamento com Bissulfito de Sódio

Soluções

- NaOH 2M
- Solução de Bissulfito de Sódio 2.5M
- Solução de Hidroquinona 1M
- Água milliQ aquecida a 80 °C (alterar durante o texto)

As soluções de Bissulfito de Sódio 2.5M e Hidroquinona 1M devem ser preparadas na hora do experimento, para que estejam frescas.

Para 8 amostras:

- 1.9 de bissulfito + 2.5 ml DDW a 80 graus celcius (2.5 ml solução Bissulfito 2.5M)
- 0.7ml de NaOH 2M
- 0.11g de hidroquinona + 1 ml DDW a 80 graus celcius (1ml de hidroquinona 1M).

1. Adicionar 0.7 ml de NaOH 2M À solução de Bissulfito de Sódio para ajustar o ph.
2. Acrescentar metade do volume (500 μ l) da solução de hidroquinona à solução de Bissulfito.
3. Adicionar 500 μ l da solução Bissulfito Hidroquinona à solução de DNA.
4. Incubar por 3 horas a 70 graus celcius em banho seco ou úmido, cobrindo os tubos com
5. papel alumínio, devido à Hidroquinona ser fotossensível.

Purificação do DNA

Soluções

- Isopropanol
- Etanol 100% gelado
- Etanol 70% gelado
- Água milliQ aquecida a 80 graus celcius
- Acetato de amônio (5M)
- NAOH 3M

OBS: Verificar a resina. Se necessário, dissolve-la a 37 graus celcius por 10 minutos, e resfria-la antes de utilizar.

Ligação do DNA

1. Adicionar 1 ml da resina à amostra.
2. Homogeneizar no agitador mecânico durante 5-10 minutos.
3. Retirar o êmbolo de uma seringa de 5ml.
4. Conectar a seringa á coluna.
5. Adicionar a amostra contendo a resina à seringa, com pipetador ou apenas vertendo o tubo.
6. Recolocar o êmbolo na seringa e pressionar até o volume passar pela coluna.

IMPORTANTE: é fundamental não deixar o êmbolo voltar, pois isso faria com que o DNA voltasse junto, retirando-o do filtro da coluna.

Lavagem

1. Desconectar a coluna de seringa e, então, retirar o êmbolo.
2. Reconectar a coluna a seringa.
3. Pipetar 4 ml de isopropanolol 80% na seringa.
4. Recolocar o êmbolo na seringa e pressionar até o volume passar pela coluna, sem que o êmbolo volte.
5. Desconectar a coluna da seringa e reposiciona-la no tubo de 2,0 ml

6. Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos, para secar a resina.

Eluição

1. Transferir a coluna para um novo tubo de 1.5ml.
2. Adicionar 45 μ l de água MilliQ autoclavada pré-aquecida a 80 graus Celsius à coluna.
3. Incubar durante 1 minuto, temperatura ambiente.
4. Centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm.
5. Retirar a coluna e descartá-la.
6. Adicionar 5,0 μ l de NaOH 3M (Cf= 0,3M).
7. Incubar durante 10 minutos, temperatura ambiente.

Precipitação

1. Adicionar 75 μ l de acetato de amônio 5M.
2. Incubar 5 minutos, para completa deaminação.
3. Adicionar 350 μ l de etanol 100% gelado.
4. Adicionar 1 μ l de glicogênio (Ci= 20mg/ml).
5. Incubar o DNA a -20 graus Celsius.

Ressuspensão

1. Centrifugar por 15 minutos a 14000rpm, temperatura ambiente.
2. Descartar o sobrenadante.
3. Adicionar 500 μ l de etanol 70% gelado.
4. Centrifugar por 15 minutos a 14000 rpm, temperatura ambiente.
5. Secar em centrífuga a vácuo ou em temperatura ambiente.
6. Ressuspender o DNA em 25-50 μ l de TE.

ANEXO D

PRECIPITAÇÃO DO DNA COM ISOPROPANOL / ETANOL

1. Adicionar 20µl de H₂O e 60µl de isopropanol 100% em cada amostra (fazer em tubos de 1,5ml).
2. Vortexar rapidamente e deixar em temperatura ambiente por 15 min (pode ficar na centrífuga, para proteger da luz).
3. Centrifugar por 25 min (14.000 rpm).
4. Descartar o sobrenadante virando e enxugando a borda do tubo no papel de filtro.
5. Adicionar 150µl de etanol 70% em cada amostra.
6. Centrifugar por 10 min (14.000 rpm).
7. Descartar o sobrenadante como em 4.
8. Deixar o pellet secando em temperatura ambiente, protegido da luz, ou acondicioná-lo no termociclador por 2 min a 80°C
9. Os tubos com o pellet seco podem ser armazenados no freezer até a hora do sequenciamento.
10. Ressuspender as amostras com 14µl de formamida