

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

FLORENÇA ABDANUR STEFANI

**AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO E DO POLIMORFISMO NO
GENE IL-6 E SUA EXPRESSÃO NA PERIODONTITE**

BELO HORIZONTE

2010

FLORENÇA ABDANUR STEFANI

**AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO E DO POLIMORFISMO NO GENE
IL-6 E SUA EXPRESSÃO NA PERIODONTITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de Mestre em Odontologia - área de concentração em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. José Eustáquio da Costa
Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Paula Rocha Moreira
Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE

2010

S816a Stefani, Florença Abdanur
2010 Avaliação da metilação e do poliformismo no gene IL-6 e sua expressão
T na periodontite / Florença Abdanur Stefani. 2010.
56 f.: il.
Orientador: José Eustáquio da Costa
Co-orientadora: Paula Rocha Moreira
Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Odontologia
1. Periodontia - Teses. 2. Metilação de DNA - Teses
I. Costa, José Eustáquio da. II. Moreira, Paula Rocha
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia .
IV. Título.

BLACK D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Odontologia
Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
Belo Horizonte - MG - 31.270-901
Tel: (31) 3409 2470 Fax: (31) 3409 2472
Email: posgrad@odonto.ufmg.br



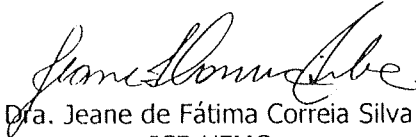
Ata da Comissão Examinadora para julgamento da Dissertação de Mestrado em Odontologia, área de concentração em **Periodontia**, da candidata **Florencia Abdanur Stefani**.

Aos 20 de agosto de 2010, às 14:00 h, na sala de Pós-Graduação (3418) da Faculdade de Odontologia, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores Dr. José Eustáquio da Costa, Dra. Paula Rocha Moreira, Dra. Ângela Guimarães Martins e Dra. Jeane de Fátima Correia Silva. O Professor Dr. José Eustáquio da Costa, Orientador da Dissertação, na qualidade de Presidente da sessão, apresentou a Comissão Examinadora e declarou abertos os trabalhos. À candidata foi dado o tempo de até 50 (cinquenta) minutos para fazer a exposição oral sobre o seu trabalho "**Avaliação da metilação e do polimorfismo no gene IL-6 e sua expressão na doença periodontal**". Encerrada a exposição, foi iniciada a argüição, dentro do limite de tempo de 30 (trinta) minutos, pelos Professores Dra. Ângela Guimarães Martins, Dra. Jeane de Fátima Correia Silva, Dra. Paula Rocha Moreira e Dr. José Eustáquio da Costa, com limite de 30 (trinta) minutos para a resposta. Terminadas as argüições, o Presidente suspendeu os trabalhos por 10 minutos para que os examinadores pudessem decidir pelo resultado a ser dado à candidata. A Comissão Examinadora opta pela *aprovação*..... da candidata. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada por mim Dr. José Eustáquio da Costa, Presidente e pelos demais membros desta comissão examinadora. Belo Horizonte, 20 de agosto de 2010.

Dr. José Eustáquio da Costa
FO-UFMG - Orientador


Dra. Ângela Guimarães Martins
UEFS-BA

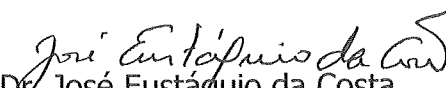

Dra. Paula Rocha Moreira
UFSJ - Co-Orientadora


Dra. Jeane de Fátima Correia Silva
ICB-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE DONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia


Dissertação intitulada "**Avaliação da metilação e do polimorfismo no gene IL-6 e sua expressão na doença periodontal**", área de concentração em **Periodontia**, apresentada por **Florencia Abdanur Stefani**, para obtenção do grau de **Mestre em Odontologia**, **APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:


Dr. José Eustáquio da Costa
FO-UFMG - Orientador


Dra. Paula Rocha Moreira
UFSJ - Co-Orientadora


Dra. Ângela Guimarães Martins
UEFS-BA


Dra. Jeane de Fátima Correia Silva
ICB-UFMG


Prof. Dr. Saul Martins de Paiva
Coordenador do Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Belo Horizonte, 20 de agosto de 2010.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Italo** e **Cacau**, por todas as formas com que me apoiaram e por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao querido **Prof. Dr. José Eustáquio Costa da Costa**, exemplo de dedicação e perseverança, meu sincero agradecimento por sua orientação e confiança.

À **Dra. Paula Rocha Moreira** pela confiança, competência ao transmitir seus conhecimentos e atenção dispensada durante todo o curso de pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez** por me receber prontamente no Laboratório de Biologia Molecular e pela ilustre contribuição científica neste trabalho

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Italo e Cacau**, que me ensinaram o valor do estudo, do trabalho, da dedicação e do amor. Desculpem-me pelas minhas inúmeras ausências.

Aos meus queridos irmãos, **Giovani e Lucca**, pelo exemplo, companheirismo e amizade.

À minha querida afilhada, **Roberta**, pela amizade e compreensão.

À amiga **Alda** pela amizade sincera e valiosos conselhos.

À **Soraya** pelo incomensurável auxílio no meu crescimento pessoal e grande motivação.

Às amigas, **Caroline Martins, Gabriela Felício e Alessandra Pinheiro** pela eterna amizade, apoio e incentivo.

Às amigas, **Ângela Guimarães e Patrícia Furtado**, grandes responsáveis pelo meu envolvimento com a Periodontia, pelo eterno carinho e motivação. Mesmo que a distância nos separe, sei que posso contar sempre.

Aos **colegas da pós-graduação**, pela convivência, experiências trocadas e por compartilharem as dificuldades e alegrias proporcionadas por essa etapa de nossas vidas. Às colegas Ana Carolina Dupim e Michele Beatriz Vianna, pela grande contribuição neste trabalho. Em especial, aos colegas **Camila Santuchi e Jasílio Vilela**, pela amizade, carinho e confiança.

Aos **amigos do Laboratório de Biologia Molecular** da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais por me acolherem e auxiliarem na execução dos experimentos. Às colegas **Cláudia Pereira e Lucyana Farias** pela companhia nos incontáveis finais semana. Ao **João Artur** por dividir seus conhecimentos, pela paciência, disposição em ajudar e pela grande contribuição na fase laboratorial deste trabalho.

Às funcionárias do colegiado de pós-graduação **Elizabeth Noronha, Lais Santiso e Zuleica Rabelo** pela alegria e carinho com que nos recebem, pela competência e por todo o auxílio prestado durante o curso de pós-graduação.

Aos **colegas do Centro de Especialidades Odontológicas (CEO)** da Prefeitura Municipal de Contagem pelo carinho, apoio, por estarem sempre dispostos a ajudar e pela compreensão nos momentos em que precisei estar ausente.

Ao **Dr. Paulo Henrique Fonseca e Dra. Cynthia Pires**, coordenadores da Saúde Bucal da Prefeitura Municipal de Contagem, pela confiança que depositaram em mim e por toda a compreensão, sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

A todos aqueles que por ventura não foram citados, mas que de alguma forma estiveram presentes nesta jornada.

Meus sinceros agradecimentos.

"Conquanto as deficiências pessoais de que possamos ser portadores, todos nos reconhecemos interessados em nossa própria melhoria interior, tentando concomitantemente, doar as nossas colaborações nas iniciativas que visem ao progresso e à assistência..."

Chico Xavier

RESUMO

A periodontite é considerada uma desordem inflamatória de etiologia bacteriana que resulta em danos ao tecido periodontal, devido à complexa interação entre os periodontopatógenos e o sistema de defesa do hospedeiro. Mecanismos genéticos e epigenéticos podem modular a resposta de um indivíduo uma vez que podem interferir na expressão gênica de importantes mediadores da inflamação. O objetivo deste estudo foi avaliar a metilação e o polimorfismo no gene da Interleucina-6 (IL-6) e sua expressão fenotípica em amostras gengivais de indivíduos com periodontite crônica. Foram coletados fragmentos de tecido gengival de 21 pacientes com periodontite crônica e de 21 pacientes com periodonto clinicamente sadio. As amostras foram submetidas à avaliação histológica, reação em cadeia da polimerase metilação específica, avaliação do polimorfismo através da enzima de restrição *HspII* e avaliação da expressão do gene IL-6 pela reação em cadeia da polimerase em tempo real. O número de células inflamatórias nos fragmentos de tecido com periodontite crônica foi maior que no grupo controle ($p=0.0001$) e o infiltrado inflamatório foi predominantemente mononuclear. A avaliação do padrão de metilação em duas regiões diferentes do gene IL-6 não foi estatisticamente diferente entre os grupos, sendo que a maior parte das amostras apresentou-se parcialmente metilada. Na análise do polimorfismo, não houve diferença estatística na distribuição dos genótipos GG, GC e CC, bem como dos alelos G e C para o gene da IL-6 em ambos os grupos. A expressão de IL-6 foi maior no grupo de indivíduos com periodontite ($p=0,041$). A elevada expressão de IL-6 é um importante fator relacionado à periodontite crônica, entretanto não foi associada ao padrão de metilação ou ao polimorfismo genético -174 (G/C), sugerindo que outros mecanismos estejam envolvidos na regulação da transcrição deste gene.

PALAVRAS-CHAVE: Periodontite, metilação do DNA, polimorfismo, Interleucina-6

ABSTRACT

METHYLATION PATTERN, POLYMORPHISM AND EXPRESSION OF INTERLEUKIN-6 IN PERIODONTAL TISSUES

Periodontitis is considered an inflammatory disorder of bacterial etiology that results in periodontal tissue destruction, as a result of complex interactions between periodontal pathogens and host and immune responses. Genetic and epigenetic mechanisms may modulate the individual response since it is able to influence the gene expression of important inflammatory mediators. The aim of this study was to evaluate the methylation pattern, gene polymorphism and expression of the Interleukin-6 (IL-6) in gingival samples from individuals with chronic periodontitis. Gingival biopsies were collected from 21 patients with chronic periodontitis and 21 patients with clinically healthy periodontium. Histologic sections stained by hematoxylin-eosin were used for histopathological evaluation. Methylation-specific polymerase chain reaction was used to verify the DNA methylation pattern and the polymorphism IL-6 -174 C/G was studied by polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction endonuclease digestion (*HspII*). The IL-6 gene expression was assessed by quantitative real-time PCR. The number of inflammatory cells in tissue fragments with chronic periodontitis was higher than in the control group ($p = 0.0001$) and the inflammatory infiltrate was predominantly mononuclear. The methylation pattern in two different regions of the gene IL-6 was not statistically different between the groups, the most of samples had were partially methylated. In polymorphism assay, no statistical difference in the distribution of genotypes GG, GC and CC, and allele G and C for the IL-6 gene in both groups were observed. The expression of IL-6 was higher in the group with periodontitis ($p = 0.041$). The high expression of IL-6 is an important factor related to chronic periodontitis, but was not associated with methylation status or the -174 (G/C) genetic polymorphism, suggesting that other mechanisms are involved in this gene transcription regulation.

KEYWORDS: Periodontitis, DNA methylation, polymorphysm, Interleukin-6

ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Descrição dos grupos de estudo.....	27
Quadro 2	Descrição das sequencias de <i>primers</i> utilizados.....	30
Figura 1	Representação dos géis para PCR do gene IL-6.....	34
Figura 2	Representação dos genótipos após a digestão com a enzima <i>HspII</i>	36
Gráfico 1	Expressão da IL-6 em cada amostra avaliada.....	38
Gráfico 2	Comparação da expressão de IL-6 nos grupos Controle e Periodontite...	38

TABELAS

Tabela 1	Padrão de metilação dos grupos Controle e Periodontite.....	35
Tabela 2	Padrão de metilação considerando a gravidade da doença.....	35
Tabela 3	Frequências dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo IL-6 G/C na posição -174, nos grupos Controle e Periodontite.....	36
Tabela 4	Frequências dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo IL-6 G/C na posição -174, considerando a gravidade da periodontite crônica.....	37
Tabela 5	Distribuição dos genótipo G+/G- da IL-6 nos grupo de estudo.....	37
Tabela 6	Expressão de IL-6 considerando os genótipos do polimorfismo IL-6 -174 G/C.....	39

ABREVIATURAS

A	Adenina
C	Citosina
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar
CEO	Centro de Especialidades Odontológicas
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
F	<i>Primer forward</i>
FCG	Fluido crevicular gengival
G	Guanina
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Metilado

MG	Minas Gerais
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MSP	Reação em cadeia da polimerase metilação específica
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Perda de inserção
PMNL	Leucócitos polimorfonucleares
PS	Profundidade de sondagem
qPCR	Reação em Cadeia da polimerase em tempo Real
R	<i>Primer reverse</i>
RNA	Ácido ribonucléico
SNP	Polimorfismo em único nucleotídeo
SS	Sangramento à sondagem
T	Timina
TA	Temperatura ambiente
Th-1	Lifócitos T <i>helper</i> 1
Th-2	Lifócitos T <i>helper</i> 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
U	Não-metilado
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	DOENÇA PERIODONTAL.....	17
2.2	PATOGÊNESE DA DOENÇA PERIODONTAL.....	18
2.3	CITOCINAS.....	19
2.3.1	INTERLEUCINA 6 (IL-6)	20
2.4	MECANISMOS EPIGENÉTICOS.....	20
2.4.1	METILAÇÃO DO DNA.....	21
2.4.2	METILAÇÃO NOS GENES RESPONSÁVEIS PELA RESPOSTA IMUNE.....	21
2.5	MECANISMOS GENÉTICOS – POLIMORFISMOS.....	22
2.5.1	POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA DOENÇA PERIODONTAL.....	23
3	OBJETIVOS	24
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4	HIPÓTESE	25
5	MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	26
5.2	GRUPOS AMOSTRAIS.....	26
5.3	COLETA DAS AMOSTRAS	27
5.4	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	28
5.5	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DAS AMOSTRAS.....	28
5.6	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	28
5.7	AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE IL-6.....	29
5.7.1	TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO.....	29
5.7.2	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE METILAÇÃO ESPECÍFICA (MSP)	29
5.8	AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO -174 G/C DO GENE IL-6.....	30

5.9	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL-6.....	31
5.9.1	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA.....	31
5.9.2	SÍNTESE DE cDNA – TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	32
5.9.3	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL – qPCR.....	32
5. 10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	33
6	RESULTADOS.....	34
6. 1	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	34
6.2	PADRÃO DE METILAÇÃO	34
6.3	AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO.....	35
6.4	EXPRESSÃO DE IL-6.....	37
7	DISCUSSÃO.....	40
8	CONCLUSÃO.....	43
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
10	ANEXOS.....	51

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais são infecções causadas por microrganismos periodontopatogênicos e seus produtos metabólicos. A presença desses microrganismos no biofilme dental desencadeia uma série de eventos inflamatórios e imunológicos nos tecidos periodontais, capaz de levar à destruição das estruturas de suporte dental (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1992).

Características específicas do biofilme, resposta imunoinflamatória e outros fatores inerentes ao hospedeiro, tais como o tabagismo e a condição sistêmica, interferem no curso da doença periodontal. Indivíduos com características clínicas e fatores de risco envolvidos semelhantes respondem de formas diferentes às terapias empregadas, o que ressalta a importância dos componentes genético e epigenético no desfecho da doença (OFFENBACHER *et al.*, 2008). Muitos estudos se empenharam em identificar polimorfismos genéticos em mediadores da resposta imune, como as citocinas, e vêm sendo considerados fatores potenciais de suscetibilidade em relação à doença periodontal (OFFENBACHER, 1996; KORNMAN *et al.*, 1997; TERVONEN *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2007).

A interleucina 6 é uma citocina pró inflamatória envolvida, no processo de reabsorção óssea, sendo encontrada em níveis elevados em indivíduos com doença periodontal grave (MOREIRA *et al.*, 2007). Genes de citocinas são alvos de múltiplos eventos epigenéticos, como metilação do DNA e desacetilação de histonas. Tais eventos envolvem o padrão de expressão gênica sem, no entanto, promover alterações na sequência de nucleotídeos (FEINBERG, 2008). Estudos recentes sugerem que estes mecanismos sejam capazes de influenciar a produção de citocinas e, conseqüentemente, alterar o padrão clínico da doença inflamatória (ADCOCK *et al.*, 2002; FITZPATRICK e WILSON, 2003; NILE *et al.*, 2008; GOMEZ *et al.*, 2009).

O papel da epigenética nas doenças auto-imunes e inflamatórias foi objetivo de estudos atuais (NILE *et al.*, 2008; GOMEZ *et al.*, 2009; MI e ZENG, 2008). A identificação de alterações epigenéticas pode apontar um novo marcador biológico preditor de gravidade de doença (NILE *et al.*, 2008). Alguns autores consideram que, por serem farmacologicamente reversíveis, conhecimentos aprofundados dos mecanismos epigenéticos poderão, no futuro, ser relevantes para o diagnóstico e terapia (BAYLIN, 2005; ALTUCCI e STUNNENBERG, 2008; KARGUL e LAURENT, 2008; TOST, 2010). Devido à importância de eventos epigenéticos na regulação da expressão gênica e à escassez de dados na literatura

referentes à doença periodontal, é importante investigar os padrões de metilação, sua associação com a gravidade da doença e com a expressão da molécula IL-6.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL

O termo doença periodontal se refere tanto à gengivite quanto à periodontite. A gengivite é uma condição inflamatória restrita ao tecido gengival, em resposta à presença de biofilme bacteriano inespecífico na superfície dental (KINANE, 2001). Caracteriza-se pela presença de sinais e sintomas de inflamação tais como edema, alteração na coloração da gengiva, sangramento à sondagem, aumento do exsudato gengival e ausência de perda de inserção. Após a remoção da placa bacteriana, todas essas alterações são reversíveis. Devido a sua alta prevalência na população dentada de todas as idades, é considerada a forma mais comum de doença periodontal (ARMITAGE, 1996; MARIOTTI, 1999).

A periodontite, em contraste com a gengivite, é menos prevalente na população em geral, porém, pode causar danos irreversíveis, como a perda do elemento dental. É considerada uma doença destrutiva devido à perda de inserção clínica, perda de osso alveolar detectável radiograficamente, formação de bolsa periodontal e inflamação gengival (KINANE, 2001). Estudos epidemiológicos mostram que apenas um pequeno número de indivíduos e uma porcentagem limitada de sítios com gengivite experimentam perda de tecido periodontal. A predisposição à doença varia consideravelmente entre indivíduos e é influenciada por uma série de fatores (ALBANDAR, 2002).

Segundo a classificação proposta pela Academia Americana de Periodontia em 1999, a periodontite pode ser dividida em agressiva ou crônica. A periodontite agressiva afeta geralmente indivíduos com menos de 30 anos de idade, e pode se apresentar de forma localizada ou generalizada. A quantidade de depósitos bacterianos é incompatível com a gravidade da destruição periodontal. A taxa de progressão é rápida e há uma tendência à agregação familiar (ARMITAGE, 1999).

A periodontite crônica caracteriza-se por ser a forma de periodontite mais comum na população adulta, podendo afetar também indivíduos jovens. A presença de irritantes locais é compatível com a gravidade da doença e a taxa de progressão é normalmente baixa ou moderada e pode apresentar períodos de rápida progressão (ARMITAGE, 1999).

2.2 PATOGÊNESE DA DOENÇA PERIODONTAL

A periodontite é considerada uma desordem inflamatória de etiologia bacteriana que resulta em danos ao tecido periodontal, devido à complexa interação entre os periodontopatógenos e o sistema de defesa do hospedeiro (SOCRANSKY E HAFFAJEE, 1992). Os processos inflamatórios e imunológicos, apesar de agirem nos tecidos periodontais, para proteger o hospedeiro contra o ataque microbiano, podem ser prejudiciais por danificarem as células e as estruturas do tecido conjuntivo (PAGE e KORNMAN, 1997).

Fatores microbiológicos causam destruição periodontal indiretamente, em decorrência da ativação de vários componentes do sistema de defesa do hospedeiro (ISHIKAWA, 2007). O processo inflamatório é inicialmente induzido pela liberação de produtos bacterianos e citocinas pró-inflamatórias que ativam o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMNL), principalmente os neutrófilos, para a região do sulco gengival. A liberação de citocinas pró-inflamatórias é capaz de regular a ação das moléculas de adesão das células endoteliais, estimulando os leucócitos a migrarem através dos vasos para a região do sulco gengival (KORNMAN, PAGE e TONETTI, 1997).

Os PMNL, apesar de estarem aumentados na presença de doença, são também os leucócitos predominantes na gengiva clinicamente sadia, sendo considerados a primeira linha de defesa contra os patógenos periodontais. A sua resposta inflamatória, quando eficaz, pode garantir a interrupção ou a resolução do processo da doença (DENNISON e VAN DYKE, 1997).

O aumento do infiltrado de PMNL para a região do sulco gengival, na presença de inflamação, é acompanhado por alterações vasculares, tais como dilatação dos capilares e elevação da pressão hidrostática com conseqüente aumento do exsudado de fluidos e proteínas para os tecidos. Além dos leucócitos, observa-se nessa fase a presença de linfócitos retidos no tecido conjuntivo quando em contato com antígenos. Para garantir espaço suficiente para esse intenso infiltrado inflamatório, observa-se também a destruição do colágeno e a degeneração de fibroblastos no tecido gengival (KORMAN, PAGE e TONETTI, 1997). Segundo Page e Schroeder (1976), essas características histológicas, classificadas como lesão inicial e precoce, correspondem clinicamente à gengivite

A evolução das características histopatológicas de lesão inicial para lesão estabelecida e avançada, marca a progressão da gengivite para a periodontite. A lesão estabelecida caracteriza-se pelo predomínio de plasmócitos e intensificação da perda de colágeno. O

epitélio sulcular e o juncional tornam-se permeáveis à penetração dos patógenos e seus produtos. Na lesão avançada ocorre a migração do epitélio juncional, com consequente aumento da profundidade do sulco, caracterizando a presença da bolsa periodontal, o que favorece a migração do biofilme em direção apical. Há também perda do osso alveolar, dano extenso às fibras do ligamento periodontal, danos inflamatórios e imunopatológicos. A lesão não está mais restrita ao tecido gengival e o infiltrado inflamatório estende-se por todo o tecido conjuntivo (PAGE E SCHROEDER, 1976; KORMAN, PAGE e TONETTI, 1997; KINANE, 2001).

Diversas citocinas estão presentes no cenário da doença periodontal. (GEMMEL *et al.*, 1997, SILVA *et al.*, 2007). Estas moléculas são produzidas por células no microambiente inflamatório e irão, pelo controle das funções de diversos tipos celulares e da migração/recrutamento celular, determinar o destino do processo inflamatório. Enquanto citocinas como IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-6 e IL-8 promovem direta ou indiretamente a atividade inflamatória, IL-4, IL-10 e IL-13 estão relacionadas à atividade anti-inflamatória. O equilíbrio entre estas citocinas e, conseqüentemente, o equilíbrio entre a representatividade das atividades coordenadas por elas, pode definir estágios diferentes da inflamação (MOREIRA, 2007). A expressão de diferentes citocinas pode representar fenótipos e estágios de desenvolvimento da doença ou transição de fases das doenças periodontais (GEMMEL *et al.*, 1997).

2.3 CITOCINAS

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular envolvidas no processo inflamatório e imune. São reguladoras celulares e produzidas principalmente por linfócitos T e macrófagos (GEMMELL *et al.*, 1997). Realizam diversas ações na resposta imunoinflamatória, na regulação do crescimento e diferenciação das células (OFFENBACKER, 1996), sendo consideradas reguladoras do processo imunoinflamatório na periodontite (ISHIKAWA, 2007).

O componente microbiano desencadeia a produção e liberação de citocinas, ativação do sistema do complemento e quimiocinas (ISHIKAWA, 2007). Tanto as citocinas pró-inflamatórias quanto as anti-inflamatórias podem ser detectadas em tecidos periodontais acometidos por periodontite, bem como nos tecidos de granulação (KINANE e LAPPIN, 2002).

2.3.1 INTERLEUCINA 6 (IL-6)

Dentre as citocinas envolvidas na patogênese da doença periodontal, destaca-se a IL-6 por estar relacionada com a absorção óssea (SODEK e McKEE, 2000; IRWIN *et al.*, 2002; MERCADO *et al.*, 2003). Experimentos *in vitro* demonstraram que a IL-6 é um fator de diferenciação para a conversão de monócitos em osteoclastos (ARMITAGE, 1996, ISHIKAWA, 2007). Significantes correlações foram observadas entre a presença de IL-6 no fluido crevicular gengival (FCG) e profundidade de sondagem, assim como, a presença de níveis elevados de IL-6 em sítios com periodontite, em progressão, e com a gravidade da doença (ARMITAGE, 1996; OFFENBACHER, 1996, MOREIRA *et al.*, 2007).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória secretada por macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Sua produção pode ser estimulada por lipopolissacarídeos (LPS), IL-1 e TNF- α (VAN SNICK, 1990). Esta citocina pode também ser produzida, localmente, por células osteoblásticas em resposta ao hormônio paratireoidiano, após o estímulo de IL-1 e TNF- α , sendo considerada importante na remodelação óssea (LÖWIK *et al.*, 1989; SODEK e McKEE, 2000). Promove a reabsorção óssea tanto sozinha quanto em sinergismo com outros fatores (FEYEN *et al.*, 1989; ISHIMI *et al.*, 1990). Tem-se mostrado potente indutora da fosfolipase A2, intermediária na via final da produção de leucotrienos, prostaglandinas e fator de ativação de plaquetas (CROWL *et al.*, 1991). A IL-6 também está envolvida na ativação, crescimento e diferenciação dos linfócitos T, em sinergia com a IL-1 (VAN SNICK, 1990 e HOUSSIAU e VAN SNICK, 1992). A expressão da IL-6 em respostas aos diversos estímulos pode ser modulada por fatores genéticos e epigenéticos uma vez que estes fatores podem alterar a transcrição gênica (BAYLIN, 2005; BÄCKDAHL, *et al.*, 2009).

2.4 MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Os mecanismos epigenéticos se referem a modificações gênicas que não são resultantes de alterações na sequência de nucleotídeos. Tais modificações podem ser hereditárias ou adquiridas ao longo da vida de um indivíduo. Fatores como tabagismo, obesidade, diabetes, envelhecimento e toxinas podem contribuir para alterações dinâmicas na modulação epigenética (OFFENBACHER *et al.*, 2008, GOMEZ *et al.*, 2009). A presença dessas modificações epigenéticas pode resultar em mudanças na via que mantém a homeostase celular (HA e CALIFANO, 2006) e interferir no desenvolvimento das doenças bucais. Fatores epigenéticos podem interferir na resposta do hospedeiro frente ao desafio bacteriano,

contribuindo para alterações nas características da doença periodontal em cada indivíduo (GOMEZ *et al.*, 2009).

Embora as alterações epigenéticas, tais como a metilação do DNA e a acetilação de histonas sejam consideradas importantes na carcinogênese humana (ARMENANTE *et al.*, 1999; KISHI *et al.*, 2005; FEINBERG, 2008), estes eventos ainda não foram bem estabelecidos na doença periodontal. A partir de 2009 surgiram as primeiras investigações do papel da metilação na periodontite (OLIVEIRA *et al.*, 2009, VIANA *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010).

2.4.1 METILAÇÃO DO DNA

Os estágios de condensação da cromatina são controlados por padrões epigenéticos reversíveis de metilação do DNA e de modificação das histonas (FEINBERG e TYCKO, 2004). Regiões ricas em citosina e guanina, conhecidas como regiões CpG, foram observadas em regiões promotoras do DNA, e a hipermetilação dessas, está associada com o inapropriado silêncio transcricional de genes supressores do tumor (HA e CALIFANO, 2006). A metilação de regiões CpG está associada à desacetilação das histonas, o que possivelmente induz à compactação da estrutura cromatina, tornando-a inacessível aos fatores de transcrição gênica (NG e BIRD, 1999).

A metilação do DNA ocorre por uma adição covalente de um grupo metil no carbono 5` do anel de citosina, resultando em 5-metilcitosina. Em condições fisiológicas normais, a metilação é mantida pela enzima DNA-metiltransferase, como mecanismo regulatório para silenciamento de genes específicos (EGGER *et al.*, 2004).

2.4.2 METILAÇÃO NOS GENES RESPONSÁVEIS PELA RESPOSTA IMUNE

Devido à natureza inflamatória da doença periodontal, a regulação da expressão das citocinas pode determinar o destino da atividade inflamatória e a progressão da doença. O equilíbrio entre as citocinas e as atividades por elas coordenadas, associados a outros fatores, podem definir estágios diferentes da inflamação. Desta forma, alterações epigenéticas em genes codificadores de citocinas podem interferir na expressão destas moléculas e conseqüentemente no desenvolvimento da doença periodontal (GOMEZ *et al.*, 2009).

Estudos dos eventos epigenéticos, avaliados em genes de citocinas, são escassos na literatura. Um dos genes estudados foi o *IFN- γ* , onde a hipometilação da região promotora foi correlacionada com um aumento na transcrição do gene, e a hipermetilação demonstrou inibir a expressão do mRNA e da proteína em linfócitos (FITZPATRIC E WILSON, 2003; HENAO-BONILLA *et al.*, 2005). Armenante *et al.* (1999) avaliaram o padrão de metilação e a expressão de IL-6 em células de carcinoma de mama. Após tratamento com o agente desmetilante (5-aza-2 deoxicetidina), na presença de TNF- α , observaram aumento da expressão da IL-6, concluindo que a hipermetilação na região promotora, em parte, é responsável pela repressão gênica nestas células. Outro estudo utilizando agente desmetilante (5-azacitidina) observou um aumento na transcrição de IL-4 e IL-6 em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico, concluindo que a hipometilação na região promotora de IL6 nestes pacientes estava associada com a gravidade da doença. (MI e ZENG, 2008). Nile *et al.* (2008) sugerem que a hipometilação no gene da IL-6 contribui para o risco de desenvolver artrite reumatóide. Estes dados sugerem que o padrão de metilação de genes codificadores de citocinas pode interferir na sua produção e assim, diante de um estímulo, o perfil da resposta inflamatória pode ser alterado, dependendo do padrão de metilação presente em genes envolvidos com a resposta imune.

Embora a identificação de genes suscetíveis à hipermetilação / hipometilação possa fornecer dados importantes sobre o desenvolvimento da doença periodontal, até o momento, poucos estudos foram conduzidos neste sentido. As alterações epigenéticas no gene da IL-6 ainda não foram avaliadas, apenas um relato sobre dados preliminares sugerem que o gene da IL6 encontra-se hipometilado, quando comparado com tecidos periodontais clinicamente sadios (OFFENBACHER *et al.*, 2008).

2.5 MECANISMOS GENÉTICOS – POLIMORFISMO

As alterações genéticas são caracterizadas por alterações na sequência genômica, podendo alterar a transcrição de proteínas, sendo exemplificadas pelas mutações esporádicas e pelo polimorfismo. Mutações foram identificadas em síndromes hereditárias com significantes alterações no periodonto, indicando que um defeito gênico pode predispor à periodontite (KINANE *et al.*, 2005).

O polimorfismo genético é definido como a ocorrência de múltiplos alelos num *locus*, no qual pelo menos dois alelos aparecem com frequências superiores a 1% (MILLER *et al.*, 2001). O polimorfismo em único nucleotídeo (SNP) é o tipo mais comum, e a sua ocorrência é estimada em 10 milhões de SNP no genoma humano. Quando um polimorfismo não altera

o aminoácido, a alteração genética é dita silenciosa. Uma vez que há alteração na expressão e/ou função da proteína, é denominado polimorfismo funcional (KINANE, 2005).

Influências genéticas e ambientais têm papel importante na suscetibilidade do hospedeiro (ALBANDAR, 2002; KINANE e LAPPIN, 2002), uma vez que a variação genética influencia a resposta imune e inflamatória frente à agressão bacteriana, podendo assim aumentar ou reduzir o risco do indivíduo para determinada doença (KINANE *et al.*, 2005).

2.5.1 POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA DOENÇA PERIODONTAL

Estudos de polimorfismos genéticos nas doenças periodontais, com ênfase em genes de citocinas, vêm sendo realizados na tentativa de elucidar a suscetibilidade do hospedeiro frente ao desafio bacteriano (KINANE, 2000; SCHENKEIN, 2002). O primeiro estudo de polimorfismo relacionado à doença periodontal foi descrito por Kornman *et al* (1997), associando o polimorfismo da citocina IL-1 com a periodontite grave em não fumantes. Posteriormente, polimorfismos em diversas citocinas foram associados à doença periodontal como IL-1 β (+3953), TNF α (-308), IL-6 (-174), entre outros (SCHENKEIN, 2002).

Devido ao importante papel da IL-6 no metabolismo ósseo, estudos têm avaliado sua variação genética na doença periodontal. O polimorfismo (G/C), no locus -174, do gene IL6 está localizado no cromossomo 7 e parece reduzir a transcrição do gene, sendo o alelo G associado à maiores níveis de expressão de IL-6 (FISHMAN *et al.*, 1998). A presença deste polimorfismo funcional tem sido associado à periodontite crônica (TREVILATTO *et al.*, 2003), à gravidade da doença (TREVILATTO *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2007) e ao aumento da expressão desta molécula na periodontite (IRWIN e MYRILLAS, 1998; MOREIRA *et al.*, 2007). Desta forma, estudos recentes descrevem o polimorfismo funcional -174 (G/C) IL-6 como um aspecto importante no entendimento da suscetibilidade do indivíduo à doença periodontal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a metilação e o polimorfismo no gene da IL-6 e sua expressão fenotípica em amostras gengivais de indivíduos com periodontite crônica

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar a presença da metilação na região promotora do gene *IL-6* em tecido gengival dos indivíduos com periodonto clinicamente saudáveis e com periodontite crônica.

Verificar a presença do polimorfismo no gene da IL-6 (-174 G/C) nos grupos de indivíduos com periodonto clinicamente saudáveis e com periodontite crônica.

Correlacionar a presença de metilação e do polimorfismo no gene *IL6* com os parâmetros clínicos da doença periodontal.

Comparar a expressão da IL-6 em tecido gengival dos indivíduos clinicamente saudáveis e com periodontite crônica.

Correlacionar a presença da metilação e a presença do polimorfismo do gene com a expressão de IL-6 nos grupos considerados.

4 HIPÓTESE

Considerando a importância da IL-6 no desenvolvimento da doença periodontal, a ocorrência de hiper ou hipometilação no gene IL-6 e do polimorfismo -174 (G/C) podem interferir na transcrição gênica e, conseqüentemente, podem estar relacionadas ao desenvolvimento e à gravidade da doença periodontal.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovado sob o número ETIC-337/08. Algumas amostras foram coletadas no Centro de Especialidades Odontológicas (CEO) da Prefeitura Municipal de Contagem – MG mediante autorização da Coordenação de Saúde Bucal.

Os participantes foram devidamente informados sobre a pesquisa, seus métodos e objetivos e incluídos na amostragem somente após a autorização pela assinatura do consentimento livre e esclarecido (ANEXO A e B). Todos os pacientes já estavam em tratamento periodontal e as orientações em relação à sua condição periodontal, a importância do tratamento, a gravidade e consequências da periodontite e do risco de perda dental associado à doença foram reforçadas.

5.2 GRUPOS AMOSTRAIS

Após a anamnese, foram realizados os exames clínicos, considerando os parâmetros periodontais de sangramento à sondagem (SS), nível de inserção clínica (NIC) e profundidade de sondagem (PS), de acordo com o modelo proposto no Anexo C, baseado em Armitage (1996). A sondagem foi realizada em seis sítios por dente e, para os parâmetros PS e NIC, foi registrado o maior valor encontrado nas superfícies vestibular, mesial, distal e lingual/palatina de todos os dentes presentes. Os dados referentes ao SS foram registrados para todas as superfícies de todos os dentes, no momento da medida de profundidade de sondagem ou até 30 a 60 segundos após, sendo anotada de forma dicotômica, como presença (+) ou ausência (-) de sangramento. Os exames foram realizados em condições adequadas de iluminação e infra-estrutura e obedecendo às normas de biossegurança. Os dentes foram previamente limpos com água e gaze estéril e secos com ar da seringa tríplice, propiciando melhor visualização da área a ser examinada. Os parâmetros clínicos periodontais foram mensurados com o auxílio de sonda milimetrada (modelo Carolina do Norte Hu-friedy®) e espelho bucal.

Os indivíduos que relataram uso de antibiótico ou anti-inflamatório nos últimos 3 meses, ou em uso contínuo de medicações que apresentam associação com crescimento gengival, os portadores de diabetes, doenças inflamatórias crônicas ou condição sistêmica em que havia indicação de profilaxia antibiótica prévia ao exame periodontal foram excluídos. Elementos

dentários com alteração endodôntica ou pericoronarite também não foram incluídos neste estudo.

Foram coletadas amostras de tecido gengival de 42 indivíduos entre 18 e 69 anos (idade mediana 35 anos) que atenderam aos critérios de inclusão. Os participantes foram alocados em dois grupos de acordo com os critérios descritos abaixo. As características destes indivíduos estão descritas no Quadro 1.

GRUPO CONTROLE – PERIODONTO CLINICAMENTE SADIO

Amostras de tecido coletadas de sítios com ausência de PS maior ou igual a 4 mm e de sinais clínicos de inflamação, proveniente de indivíduos que apresentavam no mínimo 24 dentes presentes e menos de 25% dos sítios com sangramento à sondagem.

GRUPO CASO - PERIODONTITE CRÔNICA

Amostras de tecido coletadas em sítios com SS, PS \geq 4 mm, NIC maior ou igual a 3 mm (López *et al.*, 2002) de indivíduos portadores de periodontite crônica segundo a classificação de Armitage (1999). Quanto à gravidade da doença periodontal, consideramos PS \geq 4mm e <7mm periodontite moderada e PS \geq 7mm, periodontite grave, conforme descrito previamente por Trevilatto *et al.* (2003).

QUADRO 1
Descrição dos grupos de estudo (n=42)

	Controle (n= 21)	Periodontite Crônica (n= 21)
Gênero		
Masculino (%)	8 (38,1)	6 (28,6)
Feminino (%)	13 (61,9)	15 (71,4)
Idade mediana (anos)	28 (18-69)	41 (25-58)

5.3 COLETA DAS AMOSTRAS

A amostra foi constituída por fragmentos de tecido periodontal de indivíduos adultos com periodonto clinicamente sadios e de indivíduos portadores de periodontite crônica, diagnosticados segundo os parâmetros da Academia Americana de Periodontia (ARMITAGE, 1999) e com indicação para intervenções cirúrgicas. As coletas foram

realizadas nas clínicas da Faculdade de Odontologia da UFMG e no Centro de Especialidades Odontológicas (CEO) da Prefeitura Municipal de Contagem - MG. Os fragmentos de tecidos do grupo com diagnóstico de periodontite (Grupo Caso) foram obtidos de um único sítio durante cirurgias periodontais para raspagem ou exodontias de dentes com prognóstico periodontal desfavorável. Os espécimes referentes ao grupo com periodonto clinicamente sadio (Grupo controle), foram coletados durante exodontias por indicação ortodôntica ou da região contra-lateral à invasão do espaço biológico, em cirurgias de aumento de coroa clínica, em dentes sem alteração de profundidade de sondagem no sítio selecionado para coleta.

5.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

O material coletado foi dividido em duas porções. Parte do fragmento da amostra de cada participante foi fixado em RNA *holder* (BioAgency Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e outra parte foi armazenada em Tissue-tek (Sakura, Torrance, CA, USA), ambas estocadas a -80°C.

5.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DAS AMOSTRAS

As amostras coletadas em Tissue-tek (Sakura, Torrance, CA, USA) foram submetidas a secções de 5 a 10 micrometros no criostato e posterior coloração por HE para a avaliação histológica. A contagem das células inflamatórias foi realizada no tecido conjuntivo e com aumento de 400x, considerando o maior número de campos possíveis de cada corte.

5.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A extração do DNA de cada amostra armazenada em Tissue-tek foi realizada através do QIAamp DNA Tissue Mini Kit (Qiagen 51106), com a digestão pela proteinase K, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro (BioSpec-mini, Shimadzu) e estocado a -20°C. Parte do DNA extraído foi designada para a avaliação da metilação e outra para a avaliação do polimorfismo.

5.7 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE IL-6

5.7.1 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

Parte do DNA extraído e quantificado foi modificado por tratamento com bissulfito de sódio para determinar o estado de metilação dos genes sob investigação, como previamente descrito por Goldenberg *et al.*(2004). O tratamento com bissulfito de sódio promove a desaminação das citosinas não-metiladas e as converte em uracil. As citosinas metiladas permanecem retendo sua seqüência de DNA original. Esta técnica permite distinguir o DNA metilado (M) do não-metilado (U) após a reação em cadeia da polimerase (PCR).

O tratamento com bissulfito foi realizado conforme Goldenberg *et al.*,(2004). 0,5 a 1,0 µg de DNA foi desnaturado com esperma de salmão e NaOH (2M) e incubado por 20 min. à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras de DNA foram tratadas com solução de hidroquinona (1M) e bissulfito de sódio (2.5M), permanecendo incubadas por 3h à 70°C. O DNA foi purificado utilizando o Kit de purificação *Wizard DNA Purification System* (Promega, Madison, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram desulfonadas com NaOH (3M) e precipitadas com acetato de amônio, etanol e glicogênio e incubadas a -20°C *overnight*. As amostras tratadas foram ressuspensas em Tris-EDTA, novamente quantificadas e armazenado a -20 °C até a sua posterior utilização.

5.7.2 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE METILAÇÃO ESPECÍFICA (MSP)

A técnica de PCR específico para a metilação (MSP) baseia-se nas diferenças entre as seqüências de DNA após o tratamento com bissulfito. Para cada amostra foram realizadas duas PCR, uma utilizando *primers* específicos para detecção do DNA metilado (*primer M*) e outra *primers* (*primer U*) específicos para detecção do DNA não metilado.

As sequências de primers utilizadas, específicas para a região promotora do gene da IL-6 (AY170325-1), foram desenhadas com o auxílio do programa *MethPrimer Design for Methylation PCR* (LI E DAHIYA, 2002). Duas regiões contendo dinucleotídeos CG foram estabelecidas para análise e foram denominadas MSP-1 e MSP-2. O Quadro 2 descreve os pares de *primers* utilizados.

QUADRO 2
 Descrição das sequências de *primers* utilizados

REGIÃO	PARES DE <i>PRIMERS</i>	TAMANHO DO PRODUTO
MSP-1	5` GAGATGTTTTGAAGTAATTGTATGA 3`	(F)
	5` AAATAAATTCCTCTAACTCCATCAC 3`	(R)
	5` TGGAGACGTTTTGAAGTAATTGTAC 3`	(F)
	5` AAATAAATTCCTCTAACTCCATCG 3`	(R)
MSP-2	5` AGTTTAGAGTTGTGTTTGTGTTTGT 3`	(F)
	5` CATCTTACAAAATTTATATTTATCACT 3`	(R)
	5` AGTTTAGAGTCGTGTTTGCCTTC 3`	(F)
	5` CATCTTACAAAATTTATATTTATCGCT 3`	(R)

F: forward R: reverse pb: pares de base

Ao volume de 15 µl de solução contendo aproximadamente 200 ng de DNA foi adicionado 5 µl dNTP, 0,5µl de cada *primer* a 20 pm, 0,5 µl de Platinum[®]Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies Inc., Carsbad, CA, USA), 2,5 µl de tampão específico para a enzima e 0,75µl de cloreto de magnésio. As reações foram incubadas no termociclador Eppendorf AG, Germany por 3 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 35 seg (para o *primer* MSP-2U esta temperatura foi padronizada em 55°C), e 72°C por 30 seg, com extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos da PCR foram analisados após eletroforese em gel de acrilamida a 6,5% e corados pelo método da prata.

Amostras de DNA proveniente de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram utilizadas como controle positivo da reação não-metilada. O controle positivo da metilação foi obtido a partir do tratamento de parte do DNA extraído destas células com a enzima metiltransferase MSssl (New England Biolabs, Ipswich, Mass, USA). Todos os controles positivos foram submetidos ao tratamento com bissulfito. Para controle negativo das duas reações foi utilizado 15 µl água DEPC.

5.8 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO -174 (G/C) DO GENE IL-6

O polimorfismo IL-6 -174 G/C foi avaliado por PCR seguida de digestão pela endonuclease de restrição. As alíquotas das amostras de DNA extraído não tratadas com bissulfito foram submetidas a PCR utilizando os seguintes pares de *primers*, descritos anteriormente por

Klein *et al.* (2001): 5`-CAGAAGAACTCAGATGACTG-3` (forward) e 5`-GTGGGGCTGATTGGAAACC-3` (reverse), resultando em um produto de 431 bp. Para o volume final de 25µl, foi utilizado 11,5 µl de solução de DNA genômico (400ng), 12,5 µl pré-mix I B buffer (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil) e 0,5 µl de cada primer (20 pm/reação). A reação foi mantida a 94°C por 3 min., seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 54°C por 35 seg. e 72°C por 30 seg. e extensão final a 75°C por 5 min. Os produtos da PCR foram incubados a 37°C por 4 horas para a digestão com a enzima de restrição *HSplI* (Promega, Madison, USA) para detectar os alelos G (229 + 173 + 29 bp) and C (229 + 122 + 51 + 29 bp). Os produtos da restrição foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5 % e corados pela prata.

5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL-6

5.9.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA

Cada fragmento estocado em RNA *holder* (BioAgency, São Paulo, Brasil) foi macerado em recipiente específico e posteriormente homogeneizados com *Tissue Grinder* (Kontes, Vineland, NJ, USA) em Trizol. A extração foi realizada segundo o protocolo recomendado pelo fabricante do reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA).

Foi adicionado a cada amostra 200µl de clorofórmio (Merck, Inc., Whitehouse station, NJ, USA), agitado em vórtex durante 15 seg. e incubada por 3 min. à temperatura ambiente (TA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min. a 12.000 x g a 4°C. Após a centrifugação foram observadas 3 fases na solução : fase vermelha (orgânica) composta pelo fenol-clorofórmio, interfase e fase aquosa incolor contendo o RNA. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e acrescida de álcool isopropílico (Merck, Inc., Whitehouse station, NJ, USA), incubada por 10 min. a TA e centrifugada a 4°C em 12.000 x g por 15 min., promovendo a precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e o RNA foi lavado com 1ml de álcool etílico 75% (Merck, Inc., Whitehouse station, NJ, USA), centrifugado a 12.000 x g a 4°C por 5 min., descartando novamente o sobrenadante. Após seco, o *pellet* de RNA foi ressuspensos em 15 µl de DEPC, quantificado em espectrofotômetro (BioSpec-mini, Shimadzu) e armazenado a -80°C.

5.9.2 SÍNTESE DE cDNA – TRANSCRIÇÃO REVERSA

As amostras de RNA foram tratadas com Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Oito µl de RNA tratado submetido à reação de transcriptase reversa pelo kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System For RT-PCR (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA) seguindo protocolo proposto pelo fabricante. A viabilidade das amostras foi testada através de PCR com 0,2 µl de cada *primer* (20 pm/reação), para o gene constitutivo β-actina (Forward: 5`GCT CGT CGT CGA GAA CGG CTC-3`; Reverse: 5`-CAA ACA TGA TCT GGG TCA TCT TCT C -3`) 5 µl dNTP, 0,2 µl de Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA) 2,5 µl de TaqMan específico para a enzima e 1 µl de cloreto de magnésio. A reação foi incubada por 2 min. a 94°C, seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 seg., 57°C por 30 seg., 72°C por 1 min. e extensão final de 7 min. a 72°C. Os produtos da reação foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% corados pela prata. As amostras positivas para a β-actina foram submetidas à qPCR.

5.9.3 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL (qPCR)

A expressão de IL-6 foi determinada utilizando o equipamento *Step-One Real-time PCR 48-well plate* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o sistema *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A reação foi padronizada com 200 ng de cDNA em volume final de 20 µl nas condições recomendadas pelo fabricante (95°C por 10 minuto, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto). Todas as reações foram realizadas em duplicata.

O cálculo da expressão gênica relativa foi realizado pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrita por SCHMITTGEN e LIVAK (2008), também denominado de método Ct comparativo. As alterações na expressão gênica foram calculadas com base nas diferenças entre as amostras de referência e as experimentais, normalizadas por um gene endógeno. (Applied Biosystems User Bulletin n° 2 – P/N 4303859 - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para esta análise, a amostra de referência foi constituída por *pool* de 4 amostras de sangue de pacientes clinicamente saudáveis e o gene endógeno β-actina foi utilizado como normalizador.

5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas foram realizados os testes de Exato de Fisher e Mann-Whitney, utilizando o programa Biostat 3.0 (Belém, Brasil). Foram consideradas estatisticamente significativas, as análises com $p < 0.05$.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A mediana do número de células inflamatórias por campo no grupo controle foi 3, com variação de 1 a 15 células. No grupo periodontite, a mediana foi 15 com variação de 2 a 214 células inflamatórias por campo, apresentando diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0.0001$). No grupo periodontite o infiltrado inflamatório foi predominantemente mononuclear, e no grupo controle, embora a maioria dos cortes tenha exibido infiltrado mononuclear, cerca de 37% das lâminas apresentaram infiltrado mono e polimorfonuclear.

6.2 PADRÃO DE METILAÇÃO

Na avaliação dos resultados da MSP a amplificação positiva somente para *primers* metilados (M) foi interpretada como metilação total (M^+) e a amplificação apenas para os *primers* não-metilados (U), como amostra não metilada (U^+). A amplificação positiva para ambos os *primers*, U e M, foi considerada como metilação parcial (U^+/M^+), de acordo com Kwon *et al.* (2008). Dados representativos dos resultados das reações estão ilustrados na Figura 1.

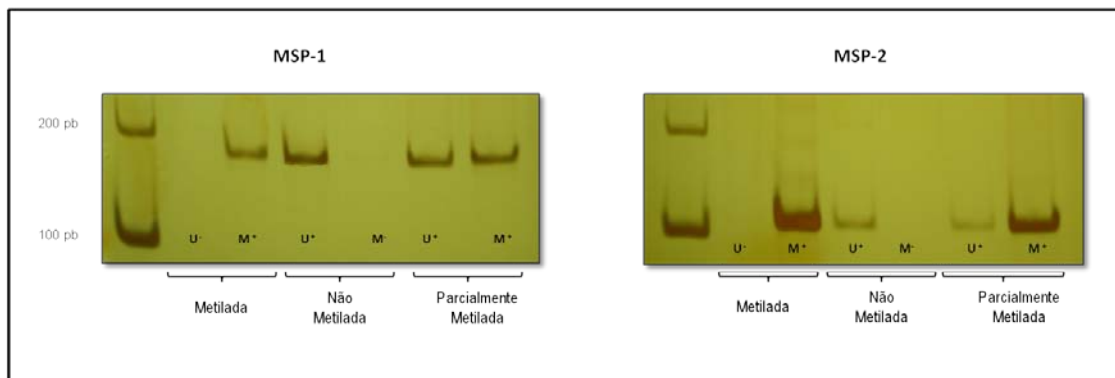


FIG1: Representações dos géis para PCR do gene IL-6

MSP-1 primer U 160 pb / primer M: 171 pb ; MSP-2: primer U e M: 104 pb

A maioria das amostras apresentou metilação parcial para os pares de *primers* MSP-1 e MSP-2 em ambos os grupos. Apenas 14,29% das amostras do grupo Periodontite foi não-metilada para os *primers* MSP-1. Nas reações com os *primers* MSP-2, 4,76% das amostras do grupo controle apresentou-se não-metilada. No grupo Periodontite, tanto para o resultado M^+ , quanto para U^+ , a frequência foi de 4,76% das amostras. Os resultados das reações com MSP-1 e MSP-2 estão descritos na Tabela 1. Não houve diferença estatística entre os grupos tanto para a região MSP-1 quanto para a MSP-2 ($p>0,05$).

TABELA 1

Padrão de metilação dos grupos controle e periodontite

	MSP-1		MSP-2	
	CONTROLE n=21	PERIODONTITE n=21	CONTROLE n=21	PERIODONTITE n=21
U ⁺ (%)	0	3 (14,29)	1 (4,76)	1 (4,76)
M ⁺ (%)	0	0	0	1 (4,76)
U ⁺ /M ⁺ (%)	21 (100)	18 (85,71)	20 (95,24)	19 (90,48)

(p>0,05)

Para as análises considerando a gravidade da periodontite foram excluídas duas amostras do grupo Periodontite por não apresentarem dados consistentes que possibilitassem a alocação em um dos grupos. Não houve associação entre o padrão de metilação, nas duas regiões estudadas, com a gravidade da periodontite crônica (P>0,05). (TAB.2).

TABELA 2

Padrão de metilação considerando a gravidade da periodontite

	MSP-1 n=19		MSP-2 n=19	
	MODERADA n=9	GRAVE n=10	MODERADA n=9	GRAVE n=10
U ⁺	2 (22)	1 (10)	0	1 (10)
M ⁺	0	0	0	1 (10)
U ⁺ /M ⁺	7 (78)	9 (90)	9 (100)	8 (80)

(p>0,05)

6.3 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO

Para a avaliação do polimorfismo IL-6 -174 G/C, foi utilizada a endonuclease de restrição *HspII*, que permite determinar os genótipos de cada amostra de acordo com as regiões clivadas, produzindo os padrões de bandas ilustrados na figura 2.

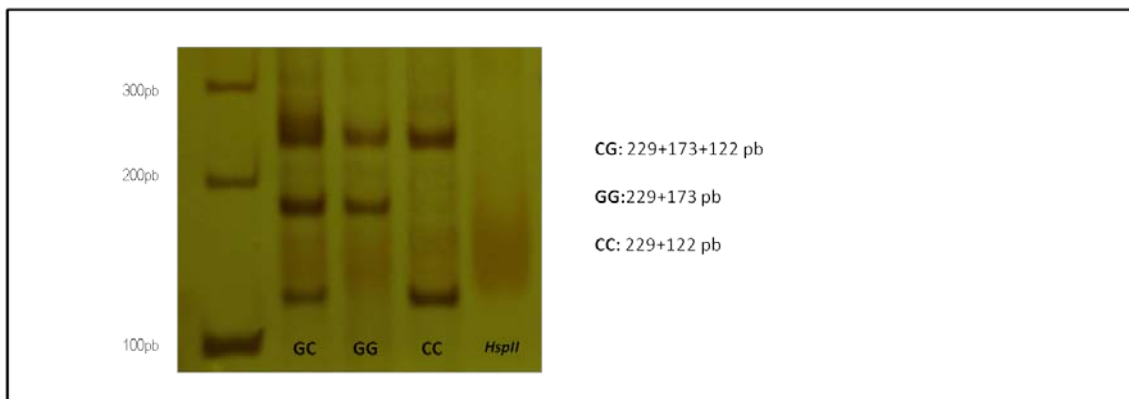


FIG. 2: Representação dos genótipos após a digestão com a enzima *HspII*

As frequências dos genótipos e alelos nos grupos controle e periodontite estão descritas na tabela 3. Os resultados não foram diferentes estatisticamente entre os grupos.

TABELA 3

Frequências dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo IL-6 G/C na posição – 174, nos grupos controle e periodontite

	Controle	Periodontite
Genótipos	n=21	n=21
GG (%)	11 (52,38)	12 (57,14)
GC (%)	8 (30,10)	8 (38,10)
CC (%)	2 (9,52)	1 (4,76)
Alelos	n=42	n=42
G (%)	30 (71,43)	32 (76,19)
C (%)	12 (28,57)	10 (23,81)

(p>0,05)

A Tabela 4 descreve os genótipos e alelos considerando a gravidade da periodontite. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as formas de periodontite moderada e grave, tanto para os genótipos (p=0,06) quanto para os alelos (p= 0,11).

TABELA 4

Frequências dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo IL-6 G/C na posição – 174, considerando a gravidade da periodontite crônica

	Moderada	Grave
Genótipos	n=9	n=10
GG (%)	3 (33,3)	8 (80,0)
GC (%)	6 (66,7)	2 (20,0)
CC (%)	0	0
Alelos	n=42	n=42
G (%)	30 (71,43)	32 (76,19)
C (%)	12 (28,57)	10 (23,81)

(p>0,05)

A presença do alelo alto-produtor para a IL-6 foi avaliada pela frequência de indivíduos G⁺ comparado com indivíduos G⁻ (TAB.5) e não foi estatisticamente diferente entre os grupos. Todas as amostras do grupo Periodontite apresentaram o genótipo G⁺ e não houve diferença estatística entre a periodontite moderada e grave. Apenas duas amostras do grupo controle apresentaram o genótipo baixo-produtor (p>0.05).

TABELA 5

Distribuição dos genótipos G⁺/G⁻ da IL-6 nos grupos de estudo.

	Controle n=21	Periodontite Moderada n=9	Periodontite Grave n=10
G ⁺ (%)	19 (90,5)	9 (100)	10 (100)
G ⁻ (%)	2 (9,5)	0	0
TOTAL	21	9	10

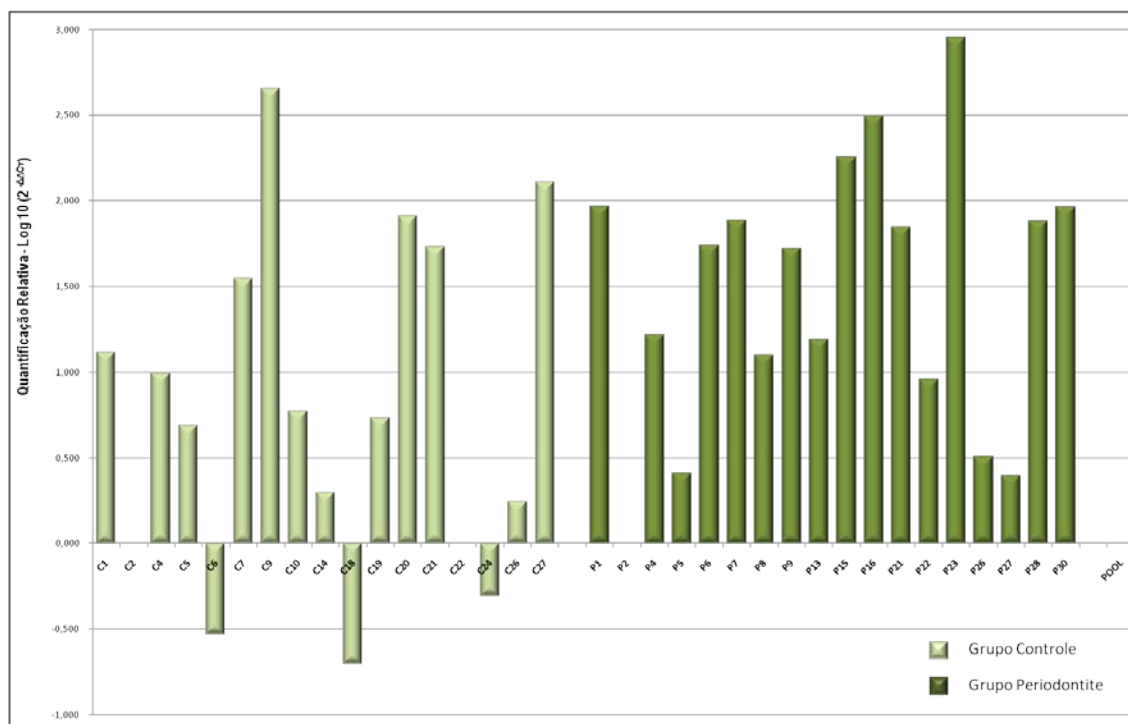
(p>0,05)

6.4 EXPRESSÃO DE IL-6

As amostras positivas para a β -actina, foram submetidas à qPCR (n=35). Os resultados foram determinados por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK SCHMITTGEN e LIVAK, 2008). O gráfico 1 representa o valor de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (em Log de 10) para cada amostra comparada com a amostra de referência (*pool*).

GRÁFICO 1

Expressão de IL-6 em cada amostra avaliada

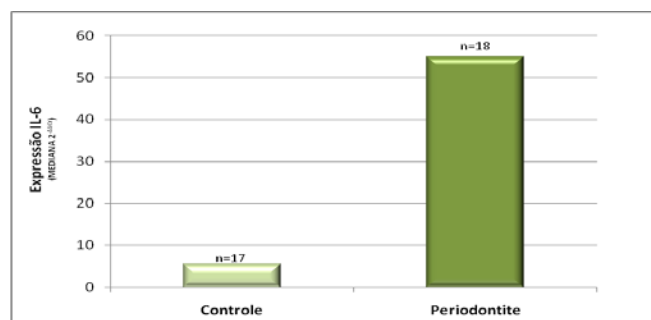


(p=0,041)

A comparação da expressão de IL-6 (Gráfico 2) mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e periodontite (p=0,041)

GRÁFICO 2

Comparação de expressão de IL-6 nos grupos controle e periodontite



(P=0,41)

Em relação à gravidade da doença, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos grave e moderada ($p=0.41$). (dados não mostrados)

Como a maioria das amostras apresentou metilação parcial, não foi possível estabelecer uma comparação entre a expressão de IL-6 e os diferentes perfis de metilação. A comparação da expressão de IL-6 com os genótipos de polimorfismo não foi estatisticamente diferente ($p>0,05$), Tabela 6.

TABELA 6
Expressão da IL-6 considerando os genótipos do polimorfismo IL-6 -174G/C

	Expressão da IL-6 (Mediana de $2^{-\Delta\Delta C_T}$)		
	Controle	Periodontite	Controle e Periodontite
GG	5,904 (n=9)	54,935 (n=9)	12,764 (n=18)
GC	20,314 (n=6)	16,015 (n=8)	16,015 (n=14)
CC	0,147 (n=2)	902,309 (n=1)	0,587 (n=3)

$(p>0,05)$

7 DISCUSSÃO

A periodontite crônica é caracterizada pela inflamação nos tecidos gengivais, seguida de perda do osso alveolar, decorrente de agressão bacteriana (ARMITAGE, 1999). Histologicamente, os tecidos acometidos pela periodontite apresentam PMNL no epitélio juncional e no epitélio da bolsa, e denso infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear no conjuntivo subjacente (FLEMMING, 1999; BATISTA *et al.*, 2002). No presente estudo o maior número de células inflamatórias no tecido conjuntivo das amostras com periodontite foi confirmado na avaliação histológica, bem como a característica predominantemente mononuclear do infiltrado.

Embora o biofilme bacteriano seja considerado a causa primária das doenças periodontais, estudos recentes enfatizam a importância do sistema imune no desenvolvimento da doença. A resposta imunológica desencadeada pelos periodontopatógenos, os níveis das citocinas produzidas e a suscetibilidade do paciente determinam o desfecho da doença (GEMMELL *et al.* 1997, KINANE *et al.*, 2005; OFFENBACHER *et al.*, 2008). Logo, a presença de alterações epigenéticas e genéticas, que determinam a expressão dos genes do sistema imune, podem interferir diretamente na patogênese da doença periodontal.

Na avaliação do padrão de metilação, o gene da IL-6 mostrou-se parcialmente metilado, tanto no grupo controle quanto no grupo periodontite. Até o momento, o único relato sobre o padrão de metilação de IL-6 na doença periodontal é uma citação sobre resultados preliminares que indicam uma hipometilação de IL-6 (OFFENBACHER *et al.*, 2008). Entretanto, os dados completos sobre esta investigação ainda não foram publicados. Na literatura consultada, a metilação de IL-6 tem sido estudada em outras doenças. Nile *et al.* (2008) identificaram hipometilação na região promotora do gene da IL-6 em indivíduos com artrite reumatóide, quando comparados com o grupo controle. Mi e Zeng (2008) concluíram que a hipometilação na região promotora de IL6 em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico estava associada com a gravidade da doença.

Recentemente, outros estudos de metilação na doença periodontal avaliaram a região promotora do gene da Interleucina-8 (IL-8). Oliveira *et al.* (2009) encontraram maior porcentagem de indivíduos apresentando hipometilação em células do epitélio oral, no grupo com periodontite crônica comparado ao grupo controle. Entretanto, no tecido gengival, os autores relataram que a maioria dos indivíduos de ambos os grupos foi positiva

para metilado e não-metilado. Outro estudo, avaliando células do epitélio oral em pacientes com periodontite agressiva, relatou maior frequência de hipometilação de IL-8 no grupo doente que no grupo controle (ANDIA *et al.*, 2010).

Embora a hipometilação esteja relacionada com aumento da expressão gênica, ao avaliar células de tecido gengival de indivíduos com periodontite, não encontramos esta relação. Este fato sugere que na doença periodontal outros mecanismos participam da modulação da expressão da IL-6, uma vez que muitos tipos celulares estão envolvidos na resposta à infecção bacteriana. De acordo com Winders *et al.* (2004), em uma população celular mista, com células em diferentes estágios de ativação, células metiladas e não metiladas podem ser observadas. A presença de metilação parcial evidenciada na maioria das amostras 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.

No presente estudo, ao avaliarmos a expressão da citocina IL-6 nas amostras consideradas, observou-se uma expressão maior no grupo periodontite comparado ao grupo controle. Entretanto, não houve associação com a gravidade da doença. Embora o aumento dos níveis da IL-6 em tecidos de indivíduos periodontalmente acometidos seja contraditória, a maioria deles sugere que essa citocina está aumentada nos sítios com periodontite (GEIVELIS *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 1995; IRWIN e MYRILLAS, 1998; IRWIN *et al.*, 2002). Uma vez que a maioria das amostras apresentou metilação parcial em ambos os grupos não foi possível estabelecer uma correlação entre a ocorrência de metilação e a expressão da IL-6.

Com o objetivo de compreendermos os mecanismos envolvidos com o aumento da expressão de IL-6 na periodontite crônica, avaliamos o polimorfismo -174 (G/C) IL-6. Não encontramos diferença na frequência de genótipos e alelos entre os grupos controle e periodontite. Estes dados estão em conformidade com diversos estudos que investigaram o papel deste polimorfismo e de outras moléculas inflamatórias no desenvolvimento das doenças periodontais (MOREIRA *et al.*, 2007 ; HOLLA *et al.*, 2002, TERVONEN *et al.*, 2007). Entretanto, Trevilatto *et al.* (2003), Moreira *et al.* (2007) e Tervonen *et al.* (2007) descreveram maior frequência do genótipo GG nos indivíduos com periodontite grave, sugerindo que o alelo G tenha um papel importante no curso da doença periodontal. Ao considerarmos a gravidade da doença, observamos maior frequência de GG nos pacientes com periodontite grave, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa ao considerar o intervalo de confiança de 5%($p=0,06$).

É importante ressaltar que o presente estudo foi delineado inicialmente enfocando a avaliação do padrão de metilação e a expressão da IL-6 nos tecidos periodontais, e posteriormente surgiu o interesse de avaliarmos a presença do polimorfismo IL-6 -174 G/C. Assim, o número de indivíduos incluídos foi menor que dos demais estudos de polimorfismos e o *n* empregado pode ser uma possível explicação para nossos resultados diferirem do apresentado pela literatura. Estudos envolvendo maior número de indivíduos poderiam confirmar a associação descrita na literatura.

Em conjunto, nossos dados sugerem que a ocorrência de metilação e de polimorfismo no gene IL-6 não estão envolvidas com o desenvolvimento da doença e com a expressão fenotípica aumentada. 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 IL-6 parece ser um padrão normal em tecidos periodontais.

Na doença periodontal o desafio microbiano desencadeia uma cascata de sinalizações extra-celulares que incluem a ligação de proteínas adaptadas e a ativação de quinases que levam à ativação de fatores transcricionais. Estes fatores ligam-se ao DNA do hospedeiro, iniciando a síntese de mRNA de diversas citocinas (BARROS *et al.*, 2010). A ação das citocinas abrange muitas células levando à proliferação celular, aumento de prostaglandinas e proteases, bem como a reabsorção óssea (MERCADO *et al.*, 2003). Perturbações em quaisquer das vias que compõem o sistema inune podem resultar em alterações na expressão de moléculas inflamatórias. O papel dos mediadores inflamatórios presentes na periodontite precisa ser interpretado dentro da complexidade da doença. Assim, a interseção e a sobreposição dessas vias poderiam explicar a não associação do polimorfismo e do padrão de metilação avaliados neste trabalho com a expressão de IL-6, uma vez que a expressão desta citocina pode não ser influenciada apenas por estas duas alterações. Outros mecanismos envolvidos com a regulação de sua expressão necessitam ser pesquisados.

8 CONCLUSÃO

O padrão de metilação e o polimorfismo genético -174 (G/C) não diferiram quando considerados os parâmetros clínicos.

A metilação parcial parece ser freqüente nos tecidos periodontais e não mostrou relação com a expressão da IL-6.

A maior expressão de IL-6 no grupo periodontite não foi relacionada à ocorrência do polimorfismo genético -174 (G/C).

A elevada expressão de IL-6 é um importante fator relacionado à periodontite crônica.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDOCK, I.M.; MANEECHOTESUWAN, K.; USMANI, O. Molecular interactions between glucocorticoids and long-acting beta2-agonists. *J Allergy Clin Immunol*, v.110, n.6, p.261-268, Dec 2002. Supplement.
- ALBANDAR, J.M. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol* 2000, v.29, n.1, Apr 2002.
- ALTUCCI, L. e STUNNENBERG, H.G. Time for epigenetics. *Int J Biochem Cell Biol*, v.41, n.1, p.2-3, Jan 2009.
- ANDIA, D.C.; OLIVEIRA, N.F.P, CASARIN, R.C.V *et al.* *J Periodontol*, 2010. (In press)
- ARMENANTE, F.; MEROLA, M. *et al.* Repression of the IL-6 gene is associated. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 258, n. 3, p.644-647, May 1999.
- ARMITAGE, G. C. Periodontal Diseases: Diagnosis. *Ann Periodontol*, v. 1, n.1, p. 37-215, Nov 1996.
- ARMITAGE, G. C. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*, v.4, n.1, p. 1- 6, Dec 1999.
- BÄCKDAHL, L.; BUSHELL, A.; BECK, S. Inflammatory signaling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 41, n. 1, p.176-184, Jan 2009.
- BATISTA, A.C.; SILVA, T.A.; *et al.* Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Diseases*, v.8, n.5, p.254-260, Sep 2002.
- BAYLIN, S.B. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol Suppl*, v.2, n. 12, p. S4-S11, Dec 2005. Supplement 1.

BARROS, S.P.; WIROJCHANASAK, S.; BARROW, D.A.; *et al.* Triclosan inhibition of acute and chronic inflammatory gene pathways. *J Clin Periodontol*, V.37, n.5, p.412-418, May 2010.

CROWL R.M, STOLLER T.J., *et al.* Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J Biol Chem*, v.266, n.4, p. 2647-2651, Feb 1991.

DENNISON, D.K.; VAN DIKE, T.E. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*, v.14, n.1, p.54-78, Jun 1997.

EGGER, G.; LIANG, G.; *et al.* Epigenetic in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, v. 429, n.6990, p. 457-463, May 2004

FEINBERG, A.P. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA*, v. 299, n.11, Mar 2008.

FEINBERG, A.P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, v.4, n.2, p.143-153, Feb 2004.

FEYEN J.H.; ELFORD, P.; DI PADOVA, F.E.; TRECHSEL, U. Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone. *J Bone Miner Res*, v.4, n.4, p.633-638, Aug 1989

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*, v.102, n.7 p. 1368-1376, Oct 1998.

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

FLEMMING, T.F. Periodontites, *Ann Periodontol* v.4, n.1, p.32-37, Dec 1999.

GEIVELIS, M.; TURNER, D.W.; et al. Measurements of interleukin-6 in crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol*, v.64, n. 10, p.980-983, Oct 1993.

GEMMELL, E.; MARHALL, R.I.; SEYMOUR, G.J. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000*, v.14, n.1, p.112-143, Jun 1997.

GOLDENBERG, D.; HARDEN, S.; MASAYESVA, B.G; et al. 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, Oct 2009.

HA, P.K.; CALIFANO, Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol*, v.7, n.1, p. 77-82, Jan 2006.

HENAO-BONILLA, V.; MARTÍNEZ, R.; et al. 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.

HOLLA, L.O.; BUCKOVA, D.; FASSMANN, A.; et al. Promoter polymorphisms in the CD 14 receptor gene and their potential association with the severity of chronic periodontitis. *J Med Genet*, v.39, n. 11 , p. 844-848, Nov 1997.

HOUSSIAU, F.; VAN SINCK, J. IL6 and the T-cell response. *Res Immunol.*, v.143, n.7, p.740-743, Sep 1992.

IRWIN, C.R.; MYRILLAS, T.T.; TRAYNOR, P. et al. The role of soluble interleukin (IL) - 6 receptor in mediating the effects of IL-6 on matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase – 1 expression by gingival fibroblasts. *J Periodontal*, v. 73, n.7, p.741-747, Jul 2002.

IRWIN, C.R.; MYRILLAS, T.T; The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral dis*, v.4, n.1, p.43-47, Mar 1998.

- ISHIKAWA, I. Host responses in periodontal diseases: a preview. *Periodontol 2000*, v.43, n.1, p. 9-13, Feb 2007.
- ISHIMI, Y.; MIYAURA, C.; JIN, C.H.; AKATSU, T.; *et al.* IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol*, v. 145, n.10, p. 3297-3303, Nov 1990.
- KARGUL, J.; LAURENT, G.F. Epigenetics and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, v.41, n.1, p.1, Jan 2009.
- KINANE, D.F. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, v.25, n.1, p.8-20, Feb 2001
- KINANE, D.F. SHIBA, H., HART, T.C. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000*, v.39, n.1, p.91-117, Oct 2005.
- KINANE, D.F.; LAPPIN, D.F. Immune Process in Periodontal Disease: a review. *Ann Periodontol*, v.7, n.1, p. 62-71, Dec 2002.
- KISHI, M.; NAKAMURA, M.; NISHIMINE, *et al.* Genetic and epigenetic alteration profiles for multiple genes in salivary gland carcinomas. *Oral Oncology* v.41, n.2, p.161-169, Feb 2005.
- KORNMAN, K.S., CRANE, A.; WANG, H.Y; *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v.24, n.1, p.72-77, Jan 1997.
- KORNMAN, K.S.; PAGE, R.C.; TONETTI, M.S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*, v. 14, n. 1, p.33-53, June 1997.
- KWON, N.H.; KIM, J.S.; *et al.* DNA methylation and the 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.

LEE, H.J.; KANG, I.K. *et al.* The subgingival microflora and gingival fluid cytokines in refractory periodontites. *J Clin Periodontol*, v.22, n. 11, p.885-890, Nov 1995.

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

LÖWIK, C.W.; VAN DER PLUIJM, G.; BLOYS, H.; *et al.* Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 162, n.3, p.1546-1552, Aug 1989.

MARIOTTI, A. Dental Plaque-Induced Gingival Diseases. *Ann Periodontol*, v.4, n.1, p. 7-17, Dec 1999.

MERCADO F.B.; MARSHALL R.I.; BARTOLD P.M. Inter-relationship between rheumatoid arthritis and periodontal diseases. *J Clin Periodontol* , v.30, n.9, p. 761-772, Sep 2003.

MI, X.; ZENG, F. Hypomethylation of interleukin – 4 and – 6 promoters in T cells from systemic lúpus erythematosus patients. *Acta Pharmacol*, v.29, n.1, p.105-112, Jan 2008.

MILLER M.C., MOHRENWEISER H.W., BELL D.A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett*, v.120, n.1-3, p.269-280, Mar 2001.

MOREIRA, P.R. *Avaliação genotípica e fenotípica de moléculas envolvidas na resposta imuno-inflamatória em indivíduos com diferentes formas clínicas e gravidade da doença periodontal.* 2007. 95 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular), - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2007.

MOREIRA, P.R.; LIMA, P.M.A.; SATHLER, K.O.B. *et al.* Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease In a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol*, v.148, p. 119-129, Apr 2007.

NG, H.H.; BIRD A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* v.9, n.2, p.158-163, Apr 1999.

NILE, C.J.; READ, R.C., AKIL, M. *et al.* Methylation Status of a Single CpG Site in the IL6 Promoter is related to IL - 6 Messenger RNA Levels and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, v. 58, n.9, p.2686-2693, Sep 2008.

OFFENBACHER, S. BARROS, S.P., BECK, J.D. Rethink Periodontal Inflammation. *J Periodontol*, v.79, n. 8, p.1577-1584, Aug 2008. Supplement.

OFFENBACHER, S. Periodontal Diseases: Pathogenesis. *Ann Periodontol*, V. 1, n.1, p.821-878, Nov 1996.

OLIVEIRA, N.F.P.; DAMM, G.R. *et al.* DNA methylation status of the IL8 gene promoter in oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*,v.36, n.9, p.719-715, Sep 2009.

PAGE, RC; KORNMAN, K.S. Pathogenesis of periodontitis. An introduction. *Periodontol 2000*, v.14, n.1 , p.9-11, Jun 1997.

PAGE, R.C.; SCHOEDER, H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease: A summary of current work. *Lab Invest*, v. 34, n.3, p.235-249, Mar 1976.

SCHENKEIN, H.A. Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the climb worth the view? *Periodontol 2000*, v. 30, n.1, p. 79-90, Oct 2002.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc*, v.3, n.6, p.1101-1108, 2008.

SILVA, T.A.; GARLET, G.P.; *et al.* Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal diseases. *J Dent Res*, v.86, n.4, p.306-319, Apr 2007.

SODEK, J.; McKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol 2000*, v.24, p. 99-126, Oct 2000.

SOCRANSKY, S.S; HAFFAJEE, A.D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*, v.63, n.4, p.322-331, Apr 1992. Supplement.

STENVINKEL, P.; KARIMI, M.; JOHANSSON, S.; *et al.* Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation: a novel risk factor for cardiovascular disease? *J Intern Med*, v. 261, n. 5, p. 488-499, May 2007.

TERNOVEN, T.; RAUNIO, T.; *et al.* 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.

TOST, J. DNA Methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol Biotechnol*, v.44, n. 1, p. 71-81, Jan 2010.

TREVILATTO, P.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M.; *et al.* Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol*, v.30, n.5, p. 438-442, May 2003.

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 SNICK, J. Interleukin-6: an overview. *Ann Rev Immunol*, v.8, p.253-278, Apr 1990.

VIANA, M. B. *Estudo da metilação nos genes IFN- γ e IL-10 na doença periodontal*. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de concentração Periodontia), – Universidade Federal de Minas Gerais, faculdade de Odontologia, Belo Horizonte, 2009.

WINDERS, B.R; SCHWARTZ, R.H.; BRUNIQUEL, D.A distinct region of the murine INF- α promoter is hypomethylated from early Tcell development through mature naive and Th1cell differentiation, but is hypermethylation in Th2 cells. . *J Immunol*, v. 173, n. 12, p. 7377-7384, Dec 2004

ZHANG, S.; BARROS, S.P *et al.* Alteration of PTGS2 promoter methylation in chronic periodontitis. *J Dent Res*, v.89, n.2, p. 133-137, Feb 2010.

11 ANEXOS

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Florença Abdanur Stefani, sou dentista e aluna do curso Mestrado em Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG. Estou realizando uma pesquisa para avaliar se existem diferenças genéticas nos pacientes com doença periodontal. 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 e que pode variar de uma pessoa para outra. Para a realização dessa pesquisa, é necessário coletar um fragmento da gengiva (que chamamos de amostra). A remoção deste pequeno pedaço da gengiva é realizada durante a cirurgia que lhe foi indicada e não representa qualquer risco, incômodo ou prejuízo para o seu tratamento, pois faz parte do procedimento. Todas as informações coletadas terão finalidade exclusivamente científica e serão mantidas em sigilo. Em hipótese alguma o seu nome será divulgado. A sua participação é voluntária. Você poderá desistir de participar e cancelar o seu consentimento em qualquer momento da pesquisa. A desistência ou a não aceitação em fazer parte dessa pesquisa não irá interferir no seu tratamento no CENTRO DE ESPECIALIDADES ODONTOLÓGICAS (CEO) da prefeitura Municipal de Contagem.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG: _____, aceito participar deste estudo de forma voluntária e afirmo que devidamente esclarecido quanto aos objetivos da pesquisa, quanto à preservação da minha imagem e quanto ao destino dos dados coletados. Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a coleta e a utilização da amostra neste projeto de pesquisa.

Sei que posso desistir a qualquer momento sem que isso acarrete qualquer tipo de prejuízo para meu tratamento no CEO da Prefeitura Municipal de Contagem. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Contagem, ____ de _____ de 2009.

Assinatura

Pesquisador responsável: Dra. Florença Abdanur Stefani

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

COEP: Comitê de Ética na Pesquisa

Av. Antônio Carlos, 6.627. Unidade Administrativa II, 2º andar Telefone: (31) 3409-4592

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Florença Abdanur Stefani, sou dentista e aluna do curso Mestrado em Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG. Estou realizando uma pesquisa para avaliar se existem diferenças genéticas nos pacientes com doença periodontal. 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 e que pode variar de uma pessoa para outra. Para a realização dessa pesquisa, é necessário coletar um fragmento da gengiva (que chamamos de amostra). A remoção deste pequeno pedaço da gengiva é realizada durante a cirurgia que lhe foi indicada e não representa qualquer risco, incômodo ou prejuízo para o seu tratamento, pois faz parte do procedimento. Todas as informações coletadas terão finalidade exclusivamente científica e serão mantidas em sigilo. Em hipótese alguma o seu nome será divulgado. A sua participação é voluntária. Você poderá desistir de participar e cancelar o seu consentimento em qualquer momento da pesquisa. A desistência ou a não aceitação em fazer parte dessa pesquisa não irá interferir no seu tratamento na UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG: _____, aceito participar deste estudo de forma voluntária e afirmo que devidamente esclarecido quanto aos objetivos da pesquisa, quanto à preservação da minha imagem e quanto ao destino dos dados coletados. Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a coleta e a utilização da amostra neste projeto de pesquisa.

Sei que posso desistir a qualquer momento sem que isso acarrete qualquer tipo de prejuízo para meu tratamento na UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 2009.

Assinatura

Pesquisador responsável: Dra. Florença Abdanur Stefani

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

COEP: Comitê de Ética na Pesquisa

Av. Antônio Carlos, 6.627. Unidade Administrativa II, 2º andar Telefone: (31) 3409-4592

ANEXO C

PESQUISA PARA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO FICHA CLÍNICA

DADOS PESSOAIS DO PACIENTE

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

ANAMNESE

1. Queixa principal:

2. Início e evolução da doença:

4. Está sob tratamento médico?

5. Faz uso de algum medicamento?

6. Fez uso de antibiótico e/ou antiinflamatórios nos últimos 6 meses?

8. Tem algum tipo de alergia?

9. Apresenta algumas das seguintes condições:
 - () Alteração de pressão arterial
 - () Alteração cardíaca
 - () Hemorragias ou doenças hematológicas
 - () História de febre reumática
 - () Doença /alteração respiratória
 - () Doença /alteração gastro-intestinal
 - () Doenças renais
 - () Diabetes ou doenças endócrinas
 - () Outros

19. Antecedentes familiares:

20. Você fuma ou bebe?

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

Belo Horizonte ____ de _____ de _____.

Assinatura do Paciente ou Responsável

EXAME RADIOGRÁFICO

Data: __/__/__

PERIODONTOGRAMA

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Profundidade de Sondagem																
Perda de inserção																
Mobilidade																

	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	
Profundidade de Sondagem																	
Perda de inserção																	
Mobilidade																	
Furca																	

Data exame: __/__/__
Data coleta: __/__/__

OBSERVAÇÕES

Aluna: Florença Abdanur Stefani
Orientador: Prof. Dr. José Eustáquio da Costa
Co-orientadora: Dra. Paula Rocha Moreira