



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Gilcy Raymundo Damm

**Análise de Metilação no Promotor do Gene da
MMP-3 em Células Epiteliais Bucais e de Tecido
Gengival e Expressão Genética em Indivíduos com
Periodontite Crônica Fumantes e
Não-Fumantes**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biologia Bucodental, área de concentração Histologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula de Souza Pardo

Piracicaba

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8^a. / 6159

D185a	<p>Damm, Gilcy Raymundo. Análise de metilação no promotor do gene da MMP-3 em células epiteliais bucais e de tecido gengival e expressão genética em indivíduos com periodontite crônica fumantes e não-fumantes. / Gilcy Raymundo Damm. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientador: Ana Paula de Souza Pardo. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Tabaco. 2. Periodontite. I. Pardo, Ana Paula de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p>(mg/fop)</p>
-------	---

Título em Inglês: Analysis of MMP-3 gene promoter methylation status in epithelial cells from oral mucosa and gingival tissue cells and genetic expression in smokers and non-smokers subjects with chronic periodontitis

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Tabacco. 2. Periodontitis

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Sergio Roberto Peres Line, Ana Paula de Souza Pardo, Maria Cristina Leme Godoy dos Santos

Data da Defesa: 20-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 20 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata GILCY RAYMUNDO DAMM aprovada.


PROFa. DRa. ANA PAULA DE SOUZA PARDO


PROFa. DRa. MARIA CRISTINA LEMÉ GODOY DOS SANTOS


PROF. DR. SERGIO ROBERTO PERES LINE

*Dedico ao cientista brasileiro
que apesar de todos os problemas sempre realiza seu trabalho.*

Agradecimento especial

A minha orientadora, Prof. Dr. Ana Paula de Souza Pardo, pelos ensinamentos e por ter sido doce nos momentos certos, mas saber ser firme e forte quando necessário. Obrigada pela condução deste trabalho e pela amizade.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP), na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto pela utilização de suas instalações.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Junior Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Fausto Bérzin, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Bucal-Dental da FOP/UNICAMP, por sua amizade e pela seriedade na condução do Curso.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo patrocínio oferecido que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sergio Roberto Peres Line, pelos ensinamentos, apoio no projeto e pelo incentivo à prova de mestrado.

Aos meus pais Gilsa Raymundo Damm e Thieres Cydiney Damm, pelo amor incondicional e pelo apoio financeiro.

À Naila Francis pelo apoio, segurança, discussões e conselhos.

À Marisi Aidar sempre com bom humor e paciência. Ajudou desde a coleta das amostras até com conversas horas a fio no telefone. Com seu jeito direto, divertido e alegre ser.

Aos voluntários que gentilmente cederam aos apelos da ciência e contribuíram com a coleta de DNA na cessão do material de estudo.

À Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, Crica, amiga, companheira, comparsa, conselheira, me faltam palavras para descrever tudo o que você fez por mim.

Ao Marcelo Marques, conselheiro e companheiro das madrugadas, finais de semanas e feriados no laboratório.

À Eliene Aparecida Orsini Narvaes, Maria Aparecida Varella (as minhas anjinhas) e Gustavo Narvaes Guimarães pelo auxílio técnico no laboratório de Histologia, conversas e conselhos regados a muito bom humor.

À Suzete Regina Tobias Neder e Joelma Aparecida Machi, pela atenção junto à secretaria do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP.

À Érica, Raquel e Tatiane, secretárias da Pós-Graduação, pelo auxílio durante todo o curso.

À Luciana Mofatto, Aline Planello e Mariana Ribeiro, a Assagio nunca mais será a mesma! Obrigada pelas discussões de projeto, artigos, ciência em geral regada a muita risada, descontração e cerveja.

Ao Gabriel Andrade Maia, apesar de tudo, não tem como eu não te colocar nesse agradecimento afinal, sem você eu nunca teria vindo à Piracicaba.

Aos meus vizinhos: Rosário, Gina, Ronaldo e Mauricio. O meu recomeço seria impossível sem vocês.

À Prof. Dr. Verônica Salermo pela confiança e por abrir as portas do seu laboratório para meu doutorado e ao Marcelo Santa'ana amigo leal e fiel de todas as horas. Voltar nunca é fácil e sem vocês dois seria impossível.

Aos meus amigos do Rio de Janeiro que sempre me apoiaram, acompanharam e torceram por mim.

À todos os colegas da Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP

RESUMO

Nosso objetivo neste estudo foi investigar o padrão de metilação na posição CpG -686 do promotor da MMP-3 em células epiteliais da mucosa bucal e células do tecido gengival. Os voluntários foram divididos em três grupos: indivíduos com periodonto saudável não fumantes e indivíduos com periodontite crônica fumantes e não-fumantes. Também foi nosso objetivo analisar os níveis de expressão de RNAm da MMP-3 nestes indivíduos. Para isto, DNA foi purificado de células epiteliais bucais obtidas após bochecho com dextrose 3%. DNA e RNA foram purificados de células gengivais obtidas de biópsias de tecido gengival. O padrão de metilação na posição -686 do promotor do gene da MMP-3 foi investigado utilizando a enzima de restrição sensível à metilação *HpaII*, em seguida foi realizada a PCR e eletroforese. Amostras metiladas apresentaram amplificação positiva e amostras não-metiladas não apresentaram amplificação pela PCR. A análise estatística entre o padrão de metilação encontrado nas amostras dos diferentes grupos foi realizada pelo teste de χ^2 ao nível de 5%. A expressão relativa da MMP-3 foi analisada em aparelho real time PCR e a análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. Não foi observado diferença no padrão de metilação encontrado nas células analisadas dos diferentes grupos. A frequência de padrão de não-metilação encontrada nas células epiteliais de mucosa bucal foi 18,3% no grupo controle, 12,5% em periodontite fumante e 9,7% em periodontite não fumante, já a taxa de não-metilação nas células do tecido gengival foi maior em todos os grupos 28% no grupo controle, 38% no grupo periodontite fumantes e 27% no grupo periodontite não-fumantes. Também não foi observada diferença na expressão genética da MMP-3 entre estes grupos. Concluímos que não há associação entre o padrão de metilação encontrado na posição -686 e a periodontite crônica em fumantes ou não-fumantes.

Palavras chave: Tabaco; Metilação; Periodontite; MMP-3

ABSTRACT

The objective in this study was to investigate the methylation status of CpG site at position -686 of MMP-3 gene promoter in epithelial cells from oral mucosa and gingival tissue cells. Subjects were divided into three groups: non-smokers healthy subjects and non-smokers and smokers subjects with chronic periodontitis. Another objective was also to examine the levels of mRNA expression of MMP-3 in these individuals. For this, DNA was purified from buccal epithelial cells, that were obtained after oral rinse with 3% dextrose and DNA and RNA were purified from gingival cells that were obtained from biopsies of gingival tissue. The methylation status at position -686 of MMP-3 gene promoter was investigated using the restriction enzyme sensitive to methylation *HpaII*, subsequently the PCR and electrophoresis was performed. Methylated samples showed positive bands after PCR and non-methylated samples showed no bands after PCR. The statistical analysis between the methylation status found in this samples in each groups was performed by χ^2 test at 5% level. The relative expression of MMP-3 was examined by real time PCR and statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test at 5 % level. There was not difference in the methylation status found in the cells from each different group. The frequency of the unmethylated status found in the epithelial oral cells was 18,3% in healthy subjects non-smokers, 12,5 % subjects with chronic periodontitis smokers and 9,7% non-smokers. And the unmethylated status of gingival tissue cells was higher in all groups: 28% in healthy subjects non-smokers, 38% in smokers subjects with chronic periodontitis and 27% in non-smokers subjects with chronic periodontitis. Also, there was not difference in genetic expression of MMP-3 among these groups. We conclude that there is not association between the methylation status observed at position -686 of MMP3 gene promoter and chronic periodontitis in smokers and non-smokers.

Keywords: Tobacco; Methylation; Periodontitis; MMP-3

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Esquema do processo de formação da 5-Metilcitosina (m^5C).

Figura 02: Mecanismo pelo qual a metilação de DNA inibe a transcrição gênica.

Figura 03: Gel de poliacrilamida a 10% corado com SYBR Green gold.

Figura 04: Distribuição da porcentagem de freqüência do padrão de metilação em células epiteliais bucais de nos grupos estudados.

Figura 05: Distribuição da porcentagem de freqüência do padrão de metilação em células de tecido gengival nos grupos estudados.

Figura 06: Média e desvio padrão da expressão da MMP-3.

Figura 07: Gráficos da expressão relativa no Real Time PCR.

Figura 08: Imagem da PCR Real Time (Melting Curve) mostrando a especificidade da reação para o gene GAPDH e para o gene da MMP-3

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Características clínicas e demográficas da população estudada

Tabela 02: Primers e amplicons para MMP-3

Tabela 03: Primers e amplicons para MMP-3 e GAPDH

Tabela 04: Demonstra o padrão de metilação em células epiteliais de tecido bucal nos grupos estudados.

Tabela 05: Demonstra o padrão de metilação no promotor do gene da MMP-3 em células de tecido gengival dos três grupos analisados.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%:	- por cento
χ^2 :	- qui-quadrado
°C:	- grau celsius
μg	- micrograma
μL :	- microlitros
μM	- micromolar
A:	- adenina
C:	- citosina
cDNA	- DNA complementar
CpG:	- citosina/ ligação fosfodiéster/ guanina
DNA:	- ácido desoxirribonucléico
dNTP:	- deoxinucleotídeo
<i>et al.</i> :	- e colaboradores
G:	- guanina
h	- hora
IL- 8	- interleucina 8
IL:	- interleucina
IL-1 β	- interleucina 1 beta
Kb:	- quilo bases
KD:	- quilo dalton
M:	- molar
MBP	- <i>Methyl binding proteins</i>
MeCP	- <i>Methyl cytosine binding protein</i>
Min	- minuto
mL	- mililitro
mm:	- milímetro
MMP:	- metaloproteinase da matriz

mRNA:	- RNA mensageiro (ácido ribonucléico mensageiro)
MT-MMP	- metaloproteinase associada à membrana
MW	- massa molecular
ng	- nanograma
nm	-nanômetro
OD	- densidade óptica
ON:	- durante a noite (<i>overnight</i>)
pb:	- par de bases
PCR:	- reação em cadeia de polimerase (polymerase chain reaction)
Primer:	- oligonucleotídeo
RPM	- rotações por minuto
RT-PCR	- reação de transcrição reversa em tempo real
T:	- timina
TBE:	- tampão tris-borato-EDTA (ácido diamino tetracético).
TGF- β	- fator de transformação de crescimento beta
TIMP:	-inibidor tecidual de metaloprotease (<i>tissue inhibitors of metalloproteinase</i>)
TNF - α	- fator de necrose tumoral alfa
U:	- unidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
3 PROPOSIÇÃO	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
5 RESULTADOS	25
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXOS	50

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a maior causa de perda dental nas sociedades ocidentais é a periodontite. A periodontite (ou doença periodontal) é uma desordem inflamatória que afeta os tecidos de suporte dos dentes (periodonto) e que da fase aguda pode torna-se crônica. Está claro que o acúmulo de bactérias sobre a superfície dos dentes desencadeia a doença, porém seu agravamento e severidade são dependentes de fatores como a genética do hospedeiro, condição de saúde sistêmica e hábitos como fumar (Kornman, 2008).

Os efeitos colaterais do hábito de fumar na saúde bucal podem ser traduzidos em variados tipos de tumores malignos e na própria doença periodontal. A fumaça derivada do tabaco, principalmente como fumaça derivada do cigarro, é reconhecida como um dos piores fatores de risco para a periodontite (Page & Kornman, 1997; Bagaitkar *et al.*, 2008; Bagaitkar *et al.*, 2009). Tão importante é o assunto que na última década diversos estudos lançaram propostas para tentar entender os mecanismos de ação do fumo nos tecidos bucais (Tonetti, 1998; Johnson & Hill, 2004).

O fumo aumenta a predisposição para alterações genéticas e epigenéticas, como alteração do padrão de metilação no DNA, nas células que estão em contato com os agentes químicos da fumaça do cigarro, entre eles, os tecidos da boca (Gabriel *et al.*, 2006). A presença de metilação no DNA em regiões CpG em promotores de genes pode promover elevação ou supressão dos níveis de transcrição, podendo até mesmo silenciar totalmente a sua expressão.

Sabe-se que as MMPs estão envolvidas na inflamação. Acredita-se que a ação das MMPs nos tecidos periodontais deva ser a mais importante via efetora da destruição do tecido. A MMP-3 aparenta ter um papel central na morte celular e na inflamação (Walker & Rosenberg, 2009). Sendo que o nível sérico de MMP-3 já é considerado um marcador e fator de prognóstico para doenças inflamatórias como a artrite reumatóide (Kotake *et al.*, 2009). Assim, parece importante analisar o padrão de metilação no DNA na região promotora do gene da metaloproteinase da

matriz-3 em células epiteliais bucais de indivíduos com periodontite crônica fumantes e não-fumantes, uma vez que esta enzima é capaz de degradar vários componentes de matriz extracelular e ativar outras MMPs presentes no tecido.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Periodontite Crônica e o Hábito de Fumar Cigarro

O mecanismo pelo qual o tabaco, principalmente o hábito de fumar cigarro, gera efeitos deletérios sobre os tecidos periodontais e mucosa bucal há décadas é estudado. Alguns autores concluíram que independente de outros fatores de risco, como exemplo o controle da higiene bucal, o hábito de fumar representa um fator de risco isolado para o desenvolvimento da periodontite (Salvi *et al.*, 1997; Bagaitkar *et al.*, 2008; Laxman & Annaji, 2008; Kornman, 2008; Bagaitkar *et al.*, 2009).

A periodontite é freqüentemente mais severa e o risco estimado para o desenvolvimento é de 2.5 a 7 vezes em indivíduos que fumam quando comparada com indivíduos ex-fumantes ou não fumante estando os menores riscos entre pessoas que nunca fumaram (Papapanou, 1996). Em jovens que apresentam periodontite e com idade inferior a 33 anos o hábito de fumar é relatado em aproximadamente 50% dos indivíduos. Nestes casos o fumo aumenta o risco para a periodontite em 14 vezes ou mais (Linden & Mullaly, 1994; Schenkein *et al.*, 1995). O hábito de fumar também é um importante fator na ocorrência de periodontite refratária, isto é, os casos onde mesmo havendo boa condição de higiene bucal, controle de placa de dental e tratamento clínico a resposta à terapia é pobre, geralmente nestes casos os indivíduos são fumantes massivos (MacFarlane *et al.*, 1992; Magnusson & Walker, 1997; Salvi *et al.*, 1997).

Vários possíveis mecanismos de ação para os efeitos do tabaco têm sido investigados. Entre eles o efeito que o cigarro poderia ter sobre a qualidade e a quantidade da microflora bucal, sobre os tecidos do periodonto e principalmente sobre a função dos neutrófilos. Estudos sobre os efeitos do cigarro na microflora subgingival durante a periodontite encontraram pouco ou nenhuma diferença significativa entre as espécies bacterianas observadas em fumante e não-fumantes (Darby *et al.*, 2000; Bostrom *et al.*, 2001; van der Velden *et al.*, 2003). Enquanto

outros autores identificaram diferença significativa da microflora oral subgengival com predomínio de bactérias dentre elas a *P.gingivalis* em fumante (Haffajee & Socransky, 2001), permanecendo dúvidas sobre esta influência.

O fumo promove alterações na vascularização do tecido gengival. Tais alterações ocorrem possivelmente devido a vasoconstrição local ou também devido a alterações dos níveis de oxigênio, uma vez que a fumaça do cigarro possui monóxido de carbono (Scott *et al.*, 2001). As conseqüências destes efeitos podem ser observadas clinicamente como diminuição da coloração vermelha da gengiva, menor sangramento durante sondagem periodontal em fumantes e diminuição da quantidade de vasos sangüíneos observados clinicamente e também histologicamente (Palmer *et al.*, 2005).

O cigarro altera direta e indiretamente a função dos neutrófilos (Bagaitkar *et al.*, 2008). O fumo provoca aumento na síntese de algumas citocinas da inflamação, entre elas, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-8 (IL-8) (Zeilhofer & Schorr, 2000). Neutrófilos expressam receptores celulares para estas citocinas e sabe-se que os antagonistas naturais destas moléculas estão desregulados em indivíduos fumantes (Akgul & Edwards, 2003). Assim, em fumantes a resposta dos neutrófilos quando estimulados pelo TNF- α e IL-8 é exarcebada. A fumaça do tabaco também modifica a atividade proteolítica dos neutrófilos (Domagala-Kulawik, 2008). O recrutamento de neutrófilos para o periodonto aumenta os níveis de metaloproteinase e elastase locais (Lorencini *et al.*, 2009), enzimas que exercem importante papel na degradação do tecido. Evidências têm mostrado que o fumo pode alterar o *turnover* do colágeno, diminuindo a síntese de colágeno e elevando a síntese de metaloproteinases (Palmer *et al.*, 2005).

Na periodontite ocorre o recrutamento de polimorfonucleares que juntamente com os fibroblastos irão liberar metaloproteinases, O papel destas é de grande importância neste evento, devido ao fato da habilidade de ativar proteínas efetoras em formas latentes como quimiocinas, citocinas inflamatórias (Giannobile,

2008). Levando a destruição do tecido conjuntivo e do osso, resultando na apresentação clínica (Kornman, 2008).

Entretanto, muito pouco ou nada ainda foi investigado a respeito das alterações químicas que o cigarro pode provocar na molécula do DNA das células do periodonto e quais os efeitos que possam surtir destas possíveis alterações.

2.2 Metaloproteases da Matriz Extracelular

As metaloproteases da matriz (MMPs) compreendem uma família de enzimas que apresentam especificidade pelas macromoléculas da matriz extracelular. A família das metaloproteinases é formada por pelo menos vinte e cinco membros encontrados em humanos, que exibem similaridades estruturais e funcionais e que estão divididos em pelo menos quatro classes principais: collagenases, gelatinases, estromelinas, metaloproteinases tipo-membrana (MT-MMP) e matrilysina (Giannobile, 2008).

Estas enzimas desempenham papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos, tais como: involução pós-parto (Weeks *et al.*, 1976; Souza *et al.*, 1989), defesa da mucosa entérica (Wilson *et al.*, 1999), reabsorção óssea (Okada *et al.*, 1995), na inflamação através da migração leucocitária (Knauper *et al.*, 1993), osteoartrite (Woessner, 1994; Baragi *et al.*, 1995), doença periodontal (Birkedal-Hansen, 1993a; Katono *et al.*, 2006), crescimento e expansão de tumores benignos (Autio-Hermainen *et al.*, 1993), invasão de tumores malignos e metástase (Kenny & Lengyel, 2009; Jezierska & Motyl, 2009), infarto do miocárdio (Van den Borne *et al.*, 2009) ruptura da placa da aterosclerótica (Newby, 2008) e artrite reumatóide (Miller MC *et al.*, 2009).

As collagenases intersticiais são as mais específicas. Foram as primeiras a serem descritas (Gross & Nagai, 1962) e, durante as últimas décadas, têm sido objeto de muitos estudos que versam sobre sua expressão, distribuição, estrutura química e molecular em processos normais e patológicos. Estas enzimas

são as únicas com a capacidade de clivar a tripla hélice dos colágenos tipo I, II, III em condições fisiológicas, tornando estas moléculas suscetíveis à ação de outras enzimas.

Existem dois tipos de collagenases intersticiais que, apesar de exibirem grande semelhança estrutural e de especificidade, são codificadas por genes distintos. A MMP-1, que exibe uma distribuição ambígua, é sintetizada por fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, osteoblastos, condrócitos e osteoclastos (Birkedal-Hansen, 1993b). Quando analisada em eletroforese de gel de poliacrilamida, a collagenase de fibroblastos aparece como várias bandas com peso molecular variando entre 57 e 52 kDa. Esta variação provavelmente se deve à proteólise parcial da molécula.

A MMP-8 é produzida exclusivamente por leucócitos polimorfonucleares. Apesar de possuir um núcleo protéico muito semelhante ao da collagenase de fibroblastos, a alta taxa de glicosilação faz com que esta molécula tenha peso molecular de 75 kDa. Ao contrário da collagenase de fibroblasto, que é rapidamente secretada após a sua síntese, a collagenase de polimorfonucleares é armazenada em grânulos intracelulares que só são liberados após a ativação das células (Hibbs & Bainton, 1989).

As gelatinases são capazes de degradar colágeno tipo V e VII, elastina e gelatina (colágeno desnaturado). A gelatinase de 72 kDa (MMP-2) parece ser capaz de clivar também o colágeno tipo X (Welgus *et al.*, 1990), porém, não é ativa sobre o colágeno tipo I, II e III, laminina e proteoglicanos. A especificidade dessas enzimas sobre o colágeno tipo IV parece indicar que elas participam da remodelação e degradação da membrana basal. É também possível que a atividade gelatinolítica dessas enzimas esteja relacionada com a remoção de fragmentos de colágeno desnaturado que sofreram ação de outras metaloproteases (Reponen *et al.*, 1992; Reponen *et al.*, 1994).

A gelatinase de 72 kDa (MMP-2) é a metaloprotease mais abundante, sendo secretada por fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, osteoblastos e condrócitos, estando também presente no plasma sangüíneo

(Birkedal-Hansen, 1993a). A gelatinase de 92 kDa (MMP-9) é produzida por neutrófilos polimorfonucleares, queratinócitos e macrófagos e, ocasionalmente, por fibroblastos. Estudos de hibridização “in situ” têm demonstrado que as gelatinases de 92 kDa são fortemente expressas nos tecidos embrionários de ratos (Reponen *et al.*, 1994).

O grupo a qual a metaloproteinase da matriz-3 pertence é formado pelas estromelinas. As estromelinas-1 (MMP-3) e -2 (MMP-10) são capazes de digerir várias proteínas da matriz extracelular como a laminina, fibronectina, proteoglicano (core protéico), colágeno tipo IV, V, VII e X, colágeno desnaturado (gelatina) e caseína (Chin, Murphy; Werb, 1985; Sternlicht *et al.*, 1999; Humphries *et al.*, 2002; Medley *et al.*, 2003; Hoppmann *et al.*, 2004).

Quando analisada em gel de poliacrilamida, a MMP-3 apresenta um peso molecular entre 60 e 53 kDa. Esta enzima parece não ser expressa por leucócitos ou queratinócitos. A MMP-10 é expressa em menor quantidade e, aparentemente, pelas mesmas células que expressam a MMP-3. (Birkedal-Hansen, 1993b).

A seqüência primária da MMP-3 é 54% idêntica a colagenase de fibroblasto de pele humana sugerindo uma origem evolutiva comum entre as duas proteases (Saus *et al.*, 1987).

A MMP-3 pro-domínio, um domínio catalítico e o domínio C-terminal conservados, ela ativa com eficácia a proMMP-1 and proMMP-7 *in vitro* e tipicamente não é co-expressa com a MMP-1. Acredita-se que seu gene resultou de uma duplicação de um gene ancestral afinal os genes da (MMP-1, -3, -7, -8, -10, -12, -13, and -20) encontram-se no cromossomo 11 no 11q21-23 (Ra & Parks, 2007).

Descrita primeiramente como enzima protease pró-tumorgênica, hoje seu papel duplo no desenvolvimento do câncer já é reconhecido pois, mostrou um papel de proteção em câncer de pele (López- Otín & Matrisian, 2007).

Hoje reconhece o papel da MMP-3 em doenças neurodegenerativas associadas a isquemia, trauma cerebral, neuroinflamação, esclerose múltipla,

doença de Alzheimer's, doença de Parkinson's disease e derrame (Choi *et al.*, 2008).

A MMP-3 participa da sinalização molecular intracelular que modula a resposta neuroinflamatória. Neurônios dopaminérgicos em apoptose liberam metaloproteinase da matriz-3 e a inibição farmacológica da atividade dessa proteína consegue suprimir os fenômenos que ocorrem nestas células em morte celular através da inibição da ativação da caspase-3 sugerindo um papel importante nesse processo (Choi *et al.*, 2008).

Cogita-se um papel central da MMP-3 na inflamação (Walker & Rosenberg, 2008) uma vez que esta enzima poderia aumentar a resposta inflamatória. Por ser responsável pela clivagem de várias proteínas do estroma como a fibronectina, pela degradação de proteínas da membrana basal como a laminina e colágeno IV e proteínas de complexos juncionais como a E-caderina e pela ativação de moléculas sinalizadoras importantes, como a forma latente do TGF- β 1, IL-1 β e TNF- α que participam da cascata pró-inflamatória (Parks *et al.*, 2004), e também por participar da ativação do zimógeno de outras MMPs, como a MMP-1 responsável pela quebra da tríplice hélice do colágeno tipo I (Birkedal-Hansen, 1993b), a MMP-3 poderia amplificar a resposta inflamatória mesmo em níveis discretos.

As MMPs são transcritas e secretadas para a matriz extracelular ou ficam ancoradas na superfície da membrana celular com seu domínio catalítico voltado para o espaço extracelular. São secretadas como zimógeno ou complexadas na forma enzima-inibidor (Stricklin *et al.*, 1983; Emonar & Grimaud, 1990) sendo que sua ativação se dá em duas etapas.

Inicialmente o zimógeno sofre clivagem proteolítica que resulta na remoção da porção amino-terminal. A clivagem pode ser feita por várias enzimas como a tripsina, plasmina, catepsina B e elastase. Numa segunda etapa, a enzima sofre autodigestão que resulta na sua forma ativada (Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990).

Acredita-se que a ativação é causada pela ruptura da ponte existente entre o aminoácido cisteína e o íon zinco, que bloqueia o sítio ativo da molécula. Outra característica comum entre as metaloproteases é a dependência pelos íons zinco e cálcio. O domínio catalítico típico de uma MMP apresenta um íon zinco (motivo do prefixo “metalo”) ligado a três resíduos de histidina, com importância crucial para o funcionamento adequado destas enzimas (Souza *et al.*, 2000). Os dois átomos de cálcio conferem uma estabilidade para a estrutura terciária da proteína (Dioszegi *et al.*, 1995).

Pelo menos três importantes mecanismos reguladores podem controlar a ação das MMPs: a regulação dos níveis de transcrição, ativação do zimógeno na matriz extracelular e a inibição das MMPs pelos inibidores teciduais (TIMPs). O controle da transcrição tem sido considerado a etapa principal na regulação da atividade das MMPs. Entretanto, o controle da atividade das enzimas é também de máxima importância. Com exceção da MMP-2 (gelatinase-A) que é encontrada em níveis baixos no tecido normal, as MMPs são transcritas somente quando requeridas durante a remodelação fisiológica da matriz extracelular ou durante destruição tecidual em uma patologia (Matrisian, 1990; Fini *et al.*, 1998; Ye, 2000).

A expressão das MMPs pode ser aumentada ou diminuída por proteínas da matriz extracelular (sinalização química), stress celular, ésteres de forbol e alterações na morfologia celular (Kheradmand *et al.*, 1998). Expressão de MMPs pode ainda ser induzida pelos seus próprios substratos e especificamente reprimida por este. Como exemplo, colágeno tipo I atua como ligante para receptores tipo tirosina kinase que induz expressão da MMP-1 mas torna-se inativo após a degradação do colágeno pela MMP-1 (Vogel *et al.*, 1997, Shrivastava *et al.*, 1997).

A expressão de MMPs pelas células do tecido periodontal (fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos e macrófagos) e células da inflamação pode ser regulada por citocinas. Um mesmo sinal molecular pode regular a expressão de várias MMPs. TGF reprime a transcrição da MMP-1 e MMP-3 enquanto induz a transcrição da MMP-13 (colagenase-3) e MMP-2 (Uria *et al.*,

1998; Birkedal-Hansen, 1993a). Em fibroblastos do periodonto a IL-1 β e TNF-1 α podem aumentar a síntese da MMP-1, MMP-2 e MMP-3 (Birkedal-Hansen, 1993). IL-1 β e TNF-1 α têm o mesmo efeito sobre a síntese da colagenase-3 em osteoblastos (Julovi *et al.*, 2004). IL-8 recruta neutrófilos para os locais da inflamação e é capaz de promover degranulação dos neutrófilos que liberam grande quantidade de MMP-9 nos locais da inflamação (Opdenakker *et al.*, 2001).

Alguns estudos têm mostrado que as MMPs também afetam direta ou indiretamente a ação das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Estudos recentes revelaram a existência de sítios de ligação para substratos não-colágenos denominados exocites, localizados fora do sítio ativo das MMPs e capazes de degradar moléculas polipeptídicas como citocinas e quimiocinas (Overall, 2002). Muitas citocinas e fatores de crescimento necessitam de proteólise para tornarem-se ativos e muitas vezes este processo requer a participação das MMPs. Pelo menos três MMPs (MMP-2, -3 e -9) podem converter a forma inativa da IL-1 β em sua forma ativa. Uma proteólise pode também resultar em fragmentos menores de peptídeos que podem ser mais ativos que suas moléculas precursoras. Como antes mencionado IL-8 após promover liberação da MMP-9 dos grânulos de neutrófilos torna-se alvo desta enzima e o produto desta degradação é um fragmento mais potente que a molécula de IL-8 precursora (Opdenakker *et al.*, 2001).

Vários polimorfismos genéticos são encontrados na região do promotor de MMPs, influenciando os níveis de expressão destes genes e podendo levar ao desenvolvimento ou progressão de doença, inclusive periodontite (de Souza *et al.*, 2003; Itagaki *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004; Hollá *et al.*, 2004). Polimorfismos genéticos caracterizam troca, perda ou inserção de bases nitrogenadas na molécula do DNA, mas alterações de grupos químicos na molécula de DNA também podem provocar alterações na expressão genética das metaloproteinases. Sato *et al.* (2003) observou que metilação do DNA interferiu drasticamente com a transcrição de todas as metaloproteinases (MMP-1,-2,-3,-7, -9, -14) pesquisadas em linhagens celular de tumor de pâncreas.

A regulação da atividade proteolítica das metaloproteases ocorre na matriz extracelular pela ação do seu inibidor tecidual (inibidor tecidual de metaloprotease (TIMP)). Quatro membros da família TIMP: TIMP-1, -2, -3, -4 já foram caracterizados (Herron *et al.*, 1986). Estes inibidores estão distribuídos pelos tecidos e fluídos e são secretados por diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, neutrófilos, células endoteliais, condrócitos e células neoplásicas. O mecanismo de ação da TIMP é complexo, e envolve numerosos pontos de interação com as metaloproteases. O evento principal parece ser resultado da ligação ao domínio catalítico N-terminal, do sítio ativo da metaloprotease (Murphy *et al.*, 1994). A inibição possui caráter seletivo, isto é, existe preferência na inibição. TIMP-1 parece ser mais efetivo na regulação das collagenases, enquanto que TIMP-2 é mais efetivo com o grupo das gelatinases, TIMP-3 inibe MMP-1, MMP-2 e MT-MMPs (Howard *et al.*, 1991).

A síntese e degradação das moléculas da matriz extracelular é um processo altamente regulado. Quantidades elevadas de MMPs nos tecidos podem acarretar em perda tecidual mesmo durante a remodelação fisiológica, entretanto isto não ocorre em parte pela ação das TIMPs. Desequilíbrio entre a síntese de MMPs e TIMPs pode acarretar em destruição acentuada de proteínas da matriz extracelular e em grande perda de tecido. Como a superexpressão de MMPs está envolvida também com a expansão e metástase de tumores malignos, genes de proteínas TIMP podem ser considerados supressores de tumores.

2.3 Metilação na Molécula de DNA

O termo epigenética foi introduzido por Conrad Waddington para descrever as mudanças na expressão gênica durante o desenvolvimento. Porém hoje, com o avanço dos estudos, sabe-se que o termo epigenética é mais amplo do que sua primeira descrição e uma definição mais apropriada seria modificações químicas no DNA que não alteram a seqüência de bases e que são herdáveis, controlando várias funções do genoma (Henikoff & Matzke, 1997).

Metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação são alterações químicas chamadas de epigenéticas. Todas estas podem ocorrer em proteínas histonas, formando um código nas histonas que participa do controle da conformação da cromatina (Bender, 2004). Na molécula de DNA somente ocorre a metilação, podendo controlar funções do genoma sem que haja alteração na seqüência dos nucleotídeos (Henikoff & Matzke, 1997).

Na última década a pesquisa sobre metilação na molécula de DNA cresceu dramaticamente e tornou-se uma das mais dinâmicas e interessantes áreas da Biologia Molecular (Schumacher *et al.*, 2006). O grupamento químico metil ligado ao carbono na quinta posição do anel pirimidínico da citosina, que está presente em aproximadamente 80% dos dinucleotídeos CpG no genoma humano, é um dos mais importantes entre os grupos funcionais, sendo conhecido como a “quinta” base do genoma humano (Figura 1) (Bird, 1996). Definindo, “*CpG islands*” são regiões do DNA maior que 200 pares de base contendo aproximadamente 50% de bases C e G e com uma presença esperada de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CG (Li & Dahiya, 2002).

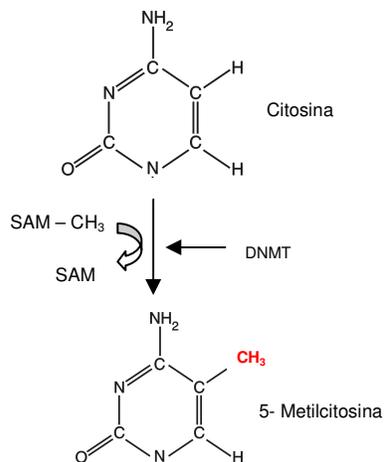


Figura 1. Esquema do processo de formação da 5-Metilcitosina (m^5C) pela DNA metil transferase

Entre estas funções citamos: recombinação durante meiose e mitose, controle da replicação, controle de DNAs “parasitas” que se inserem no genoma humano (ex.: DNA viral), estabilização e manutenção da expressão gênica, regulação da diferenciação celular, inativação do cromossomo X, sendo essencial durante a morfogênese para que ocorra desenvolvimento normal (Wolffe & Matzke, 1999; Suter *et al.*, 2004). Entretanto, aberração no padrão de metilação do promotor de um gene pode levar a perda de função deste gene e pode ser muito mais freqüente que a mutação genética.

A transcrição gênica pode ser fortemente inibida pela adição de radical metil. A presença de um “capuz” metil sobre uma citosina que precede uma guanina pode inibir a ligação de fatores de transcrição que se ligam a estas regiões. A figura abaixo mostra como isto pode acontecer: A não-ligação de fatores de transcrição aos seus sítios específicos resulta na ausência de transcrição gênica. Padrão de hipermetilação aberrante em promotores de genes vem sendo considerado um dos principais mecanismos associados com a inativação de genes principalmente, supressores de tumores no câncer (Fukushige *et al.*, 2009)

Proteínas chamadas MBPs (Methyl Binding Proteins) com afinidade pelo grupo metil se ligam às regiões CpGs localizadas nas regiões promotoras e

impedem o acesso dos fatores de transcrição aos seus sítios (Attwood *et al.*, 2002).

As primeiras MBP foram isoladas no final dos anos 80 início dos anos 90 por Bird e colaboradores. Família de proteína composta pelo menos 5 membros sendo que as mais estudadas são a MeCP 1 e MeCP2 (*Methyl cytosine binding protein*) (Dhasarathy & Wade, 2008): A MeCP1 que se liga ao grupo metil necessita de múltiplos sítios CpG próximos para se ligar e assim promover a condensação da cromatina para a forma inativa, a proteína MeCP2 pode se ligar a apenas um simples sítio CpG, promovendo alterações na cromatina semelhantes às promovidas pela proteína MeCP1.

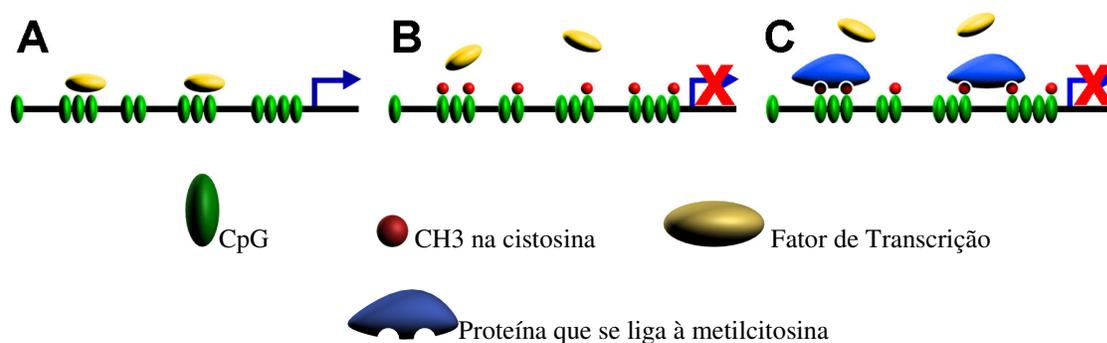


Figura 2. Mecanismo pelo qual a metilação de DNA inibe a transcrição gênica. A. Região promotora desmetilada permitindo a ligação dos fatores de transcrição. B. Metilação impedindo a ligação dos fatores de transcrição. C. A presença de proteínas que se ligam à metilcitosina em ilhas CpG bloqueiam a ligação dos fatores de transcrição.

Fonte: Attwood *et al.*, 2002.

Aberrações epigenéticas provocam síndromes (Prader-Willi [OMIM #176270], Angelman [OMIM #105830], Beckwith-Wiedemann [OMIM #130650], Rett [OMIM #312750]) e podem predispor ao câncer (Laird, 2003). Metilação no DNA é uma alteração freqüente em muitos tumores humanos e têm crescido o número de genes relacionados a tumores que apresentam metilação da base citosina em seqüências ricas em CG, normalmente não metiladas. Metilação ocorre especificamente pela ação da enzima metiltransferase (DNA metilase). Metilação em regiões ricas em CG pode ocorrer em genes implicados com diferentes funções durante o desenvolvimento do câncer como supressão do tumor (*p14*, *p15*, *p16*, *p73* e *BRCA1*), reparo do DNA (*hMLH1* e *MGMT*), invasão e metástase (*CDH1*, *ECAD*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *DAPK*) (Russo *et al.*, 2005).

A associação entre o hábito de fumar e as alterações químicas que este possa promover na molécula do DNA e que proporcione o surgimento de tumores malignos (principalmente nos tecidos que tem contato com os agentes nocivos da fumaça do cigarro) há alguns anos já vem sendo estudada (Von Zeidler *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 2005; Gabriel *et al.*, 2006). Existe uma forte semelhança em eventos que ocorrem no câncer e na inflamação crônica, havendo mediadores químicos comuns aos dois processos (Hodge *et al.*, 2005). A associação entre polimorfismos genéticos e tumores ou doença inflamatórias crônicas tem sido exaustivamente investigada e do mesmo modo a associação entre alterações epigenéticas, tumores e inflamação deve ser estudada desde que estas alterações podem propiciar o desenvolvimento de um tumor e podem também modular a inflamação.

Diferenças no padrão de metilação em sítios CpG já foram observadas em genes da resposta inflamatória (Wilson, 2008). Como exemplo, a hipometilação do gene do receptor *Toll-like-2* tem sido associada com o aumento da resposta pró-inflamatória durante infecção pulmonar em pacientes com fibrose cística (Shuto *et al.*, 2006). *In vitro*, células tratadas com interleucina-6 aumentaram a expressão da enzima DNA metiltransferase -1 (Kanai, 2008). E as próprias células T sofrem desmetilação no promotor da interleucina-2 depois da

ativação levando a produção dessa interleucina (Wilson, 2008). Também, alteração no padrão de metilação no gene da MMP-3 já foi observada em osteoartrite. (Roach *et al.*, 2005).

3 PROPOSIÇÃO

- Comparar o padrão de metilação encontrado na posição -686 do promotor do gene da MMP-3 em indivíduos com periodonto saudável e indivíduos com doença periodontal crônica fumantes e não-fumantes
- Analisar a correlação de padrão de metilação e o nível de expressão genética da MMP-3 nestes indivíduos

4 MATERIAL E MÉTODO

Seleção da Amostra

A amostra foi composta por indivíduos saudáveis, brasileiros de ambos os sexos, adultos (acima de 25 anos), fumantes (5 cigarros ou mais/dia há pelo menos 5 anos) e não-fumantes (nunca fumaram). Estes pacientes foram recrutados da clínica de especialização em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-FOP/UNICAMP. O grupo controle foi composto por alunos de pós-graduação e funcionários da FOP-UNICAMP e também indivíduos pacientes da clínica que não apresentavam problemas periodontais. Após triagem inicial, os indivíduos se foram divididos em três grupos:

- 1) Pacientes do Grupo Controle: Pacientes não fumantes, sem sinais clínicos de inflamação dos tecidos bucais e sem perda de inserção conjuntiva ≥ 3 mm

- 2) Pacientes do Grupo Periodontite Não-Fumante: Pacientes que declararam nunca fumar, com pelo menos três dentes apresentando perda de inserção conjuntiva ≥ 5 mm e sinais clínicos evidentes de inflamação gengival generalizada

- 3) Pacientes do Grupo Periodontite Fumante: Pacientes que fumam no mínimo há 5 anos e pelo menos 5 cigarros por dia, com pelo menos três dentes apresentando perda de inserção conjuntiva ≥ 5 mm e sinais clínicos evidentes de inflamação gengival generalizada

O diagnóstico de doença periodontal crônica foi baseado no diagnóstico clínico levando em consideração a perda de inserção conjuntiva. Este sistema é utilizado na clínica de graduação e pós-graduação em periodontia da FOP/UNICAMP onde recrutamos os participantes da pesquisa. Todos os

pacientes assinaram termo de consentimento para a participação voluntária na pesquisa de acordo com as normas do Comitê em Ética da Instituição (FOP/UNICAMP) (anexo 1) e preencheram uma ficha periodontal, que excluía: pacientes alcoólatras, pacientes com história de diabetes, pacientes grávidas ou em lactação, pacientes com história de hepatite e infecção por HIV ou com pré-medicação antibiótica recente como também uso crônico de antiinflamatórios (anexo 2). Ambos os sexos foram incluídos na amostra. Não foram excluídos pacientes pertencentes a qualquer grupo étnico-racial, pois a tentativa de se isolar determinadas características raciais é de pouco valor em um país altamente miscigenado racialmente.

A tabela abaixo apresenta dados clínicos e dados demográficos do grupo amostral:

Tabela 01. Características clínicas e demográficas da população estudada

Critérios	Controle	Fumante	Não Fumante
Idade (Anos)	39,69 ± 15,32	46,23 ± 7,26	44,34 ± 9,19
Varição (Anos)	17-44	28-59	27-72
% Homens	40,4	46,5	40,5
% Mulheres	59,6	53,5	59,5
Profundidade de sondagem (mm)		7,8 ± 2,02	7,9 ± 2,18
Cigarros/dia (média)		15,6 ± 7,32	
Consumo de cigarro (ano)		22,3 ± 9,26	

Extração de DNA de células de epitélio bucal

O DNA foi purificado a partir de células epiteliais bucais. As células epiteliais foram colhidas após bochecho com glicose a 3% por 2 min (Trevilatto & Line 2000). DNA genômico de células epiteliais foi purificado utilizando acetato de amônio 8M segundo protocolo de Aidar & Line 2006. Ao final, a quantidade de DNA purificado e sua pureza foram mensuradas em aparelho de espectrofotometria na razão OD 260/280.

Análise de Metilação no Promotor do Gene da MMP-3

DNA genômico foi submetido à digestão com a enzima de restrição sensível à metilação *HpaII* (*New England Biolabs*) em reação contendo 2U da enzima, 100ng de DNA genômico durante 16 h a 37°C em reações individuais de 20µL. Em seguida foram realizadas PCRs para amplificação da região analisada. A solução para reação da PCR continha: 1x *Go Taq Green Master Mix* (Promega Corporations, Madison, Wi, USA), 1,25 µM primers (Invitrogen Carlsband, CA) e DNA tratado pela enzima de restrição. Amplificação foi realizada em termociclador *Perkin Elmer modelo 9600* em 35 ciclos de: 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C, seguida de extensão final de 7 min a 72°C. Resultados positivos para posição CpG metilada apresentaram banda de ~ 442 bp. Resultados negativos para posição CpG metilada não apresentaram amplificação pela PCR devido à digestão da região pela *HpaII* (*New England Biolabs*). As bandas foram visualizadas em gel de poliacrilamida 10% em TBE 1X corridos á 20mA corado pelo nitrato de prata segundo protocolo de Sanguinetti *et al.* (1994) ou pelo *SYBR Green Gold* (Invitrogen Carlsband, CA). Para confirmação dos resultados, as amostras com resultados negativos foram realizadas uma PCR sem digestão prévia. Como controle do termociclador foi usado para cada reação de PCR uma amostra sem reagir com a enzima de restrição e para controle da reação de digestão foi usado amostras amplificadas previamente.

Abaixo estão descritos os primers que foram utilizados para a análise de metilação no gene da *MMP-3*:

Tabela 2: Primers e amplicons para MMP-3 (GenBank U43511)

Gene	Sense primer	Anti-sense primer
<i>MMP3</i>	5` GGTGGCAGGTGGCAAGAG 3`	5` ATGGGCAGAATAGAACAAAGAGG 3`

Análise do RNAm

Extração do RNA

Tecido gengival foi utilizado para a análise da transcrição do RNAm destes genes. O padrão de metilação do DNA do gene da MMP3 foi novamente investigado nas células deste tecido a fim de confirmar o padrão de metilação presente nas células da gengiva (coincidente ou não com o achado nas células epiteliais).

Assim DNA e RNA total foram purificados de células de biópsias de tecido gengival de indivíduos componentes da amostra que iriam requerer procedimento cirúrgico como parte do tratamento periodontal. Após a coleta, os tecidos foram imediatamente armazenados em solução conservante de ácidos nucléicos (BioAgency). Após, a purificação do DNA e RNA total foi realizada com reagente TRIZOL, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante para a purificação de RNA seguida da purificação de DNA (Invitrogen Carlsband, CA) descrito a seguir: os tecidos foram transferidos separadamente para tubo tipo eppendorf contendo 1ml de TRIZOL (4°C) e homogeneizados por 5 minutos em aparelho homogeneizador de tecidos tipo Turratec modelo MA-102 mini (Marconi Equipamnetos LTDA). Após, 0,2 ml de clorofórmio (Merck) foi adicionado ao TRIZOL e a solução foi manualmente agitada com delicadeza por 5 minutos a 24°C, seguida por centrifugação a 14.000 rpm, a 4°C por 15 minutos. Da interfase

aquosa/orgânica foi purificado o DNA e da fase aquosa o RNA como a seguir: A fase aquosa foi transferida para outro tubo de polipropileno e incubada por 10 minutos a 24°C, após adição de 1 ml de isopropanol (Merck). Novamente o material foi centrifugado a 14.000 rpm a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O precipitado de RNA foi lavado com etanol gelado a 75% (Merck) e centrifugado a 8.000 rpm a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado desidratado por cerca de 40 minutos a 24°C. Em seguida o material foi diluído em 30µl de água livre de nucleases, incubado a 56°C por 5 minutos e guardado em freezer -70°C.

Da interfase aquosa/orgânica foi purificado o DNA conforme protocolo do fabricante como a seguir: 0,3ml de etanol 100% foram adicionados para cada 1 ml de TRIZOL e as amostras foram misturadas por inversão. Após, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante contendo proteínas foi separado e deste foram purificado proteínas que estão armazenadas em -20°C para futuras análises (material ainda não testado). O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes com 1 ml de solução contendo 0,1 M citrato de sódio em etanol 10% durante 30 min e centrifugado a 2000rpm por 5 min a 4°C. Em seguida o *pellet* de DNA foi seco a temperatura ambiente por 40 min, diluído em 0,3 ml de tampão TE (Tris-EDTA) e armazenado -20°C.

Uma alíquota de 2µl foi utilizada para determinar a concentração de DNA e RNA/µl nas amostras por espectrofotometria (OD 260/280 nm). Ambos foram considerados puros quando a razão entre as duas leituras esteve acima de 1,8.

Após, 1µg do RNA total foi submetido ao tratamento com DNase I Amplification Grade (Invitrogen Carlsband, CA) segundo protocolo do fabricante. Para tanto, o RNA foi dissolvido para um volume final de 8µl com adição de 1µl de tampão e 1µl de enzima DNase. Após 15 minutos de incubação a 37°C foi adicionado 1µl de EDTA e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 70°C para a inativação da enzima DNase. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado após reação de transcrição reversa utilizando o kit *Superscript III First-Strand*

Synthesis SuperMix (Invitrogen Carlsband, CA), contendo 500ng de RNA em volume final de reação de 20 μ l.

Reações de PCR em tempo real (RT-PCR Real Time)

A expressão quantitativa do gene da MMP-3 foi analisada utilizando reações de PCR em tempo real, pelo sistema *SYBRGreen*. Os iniciadores da PCR adequados para tais reações foram criados a partir de seqüências de mRNA para os genes alvos encontradas no *GenBank*. Os primers foram confeccionados utilizando o *software LightCycler probe design* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). A reação quantitativa da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foi realizada no equipamento *LightCycler 2.0* (Roche Diagnostics GmbH) utilizando o sistema *Fast-Start DNA Master Plus SYBR Green kit* (Roche Diagnostic Co.). Para as reações de PCR em tempo real para MMP3 foram utilizados: 4 μ l do reagente do *kit*, 9 μ l de água *nuclease-free*, 1 μ l da solução contendo cada primer (10 μ M) e 5 μ l de cDNA. Durante a padronização, os produtos de amplificação também foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em comparação a padrões de peso molecular, para análise de presença ou ausência de bandas inespecíficas.

Para a análise da expressão gênica, como no caso deste estudo, se utiliza comumente a expressão relativa, onde o dado é normalizado de acordo com a expressão de um gene constitutivo, chamado de gene de referência. Entre os genes de referência utilizados para experimentos de PCR em tempo real estão os genes da gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH), β -actina, ribossomal 18S e a hipoxantina guanina fosfotransferase HPRT. Neste estudo, o gene de referência escolhido foi GAPDH. Para as reações de PCR em tempo real para GAPDH foram utilizados: 4 μ l do reagente do *kit*, 9,8 μ l de água *nuclease-free*, 0,6 μ l da solução contendo cada primer (10 μ M) e 5 μ l de cDNA.

A tabela 3 mostra as seqüências de primers escolhidas para serem utilizadas nas reações de RT-PCR em tempo real:

Tabela 3: Primers e amplicons para MMP-3 e GAPDH

Gene	Sense primer	Anti-sense primer	Amplicon
MMP3	5' GGATACAACAGGGACCAATTTA 3`	5` TCATCTTGAGACAGGCGG 3`	150pb
GAPDH	5`GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3`	5` GAAGATGGTGATGGGATTTTC 3`	226pb

Análise Estatística dos Resultados

O padrão de metilação encontrado no DNA dos indivíduos do grupo controle *versus* grupo doença periodontal fumante *versus* não-fumante foi avaliado pelo teste χ^2 ao nível de significância de 5%. A análise dos níveis de expressão gênica entre os grupos foi testada utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5%. A correlação entre padrão de metilação encontrado no DNA e expressão gênica foi analisado pelo teste de coeficiente não-linear de Spearman ao nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

A figura abaixo apresenta o padrão das bandas após a reação positiva da PCR:

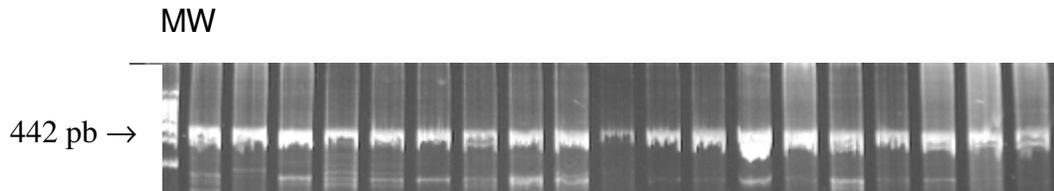


Figura 3. Gel de poliacrilamida a 10% corado com SYBR Green gold mostrando um padrão de bandas para a PCR da MMP-3

Análise da MMP-3

O padrão de metilação encontrado na posição -686 do promotor do gene da MMP-3 apresentou variação em todas as células dos tecidos analisados, mas não mostrou diferença significativa entre as células destes tecidos nos diferentes grupos. Quando células epiteliais de mucosa bucal foram investigadas nós observamos um padrão de não - metilação em 18,3% dos indivíduos do grupo controle, 12,5% nos indivíduos do grupo fumante e 9,7% nos indivíduos do grupo não fumante ($p= 0,2960$, χ^2 teste) (Figura 4 e Tabela 4).

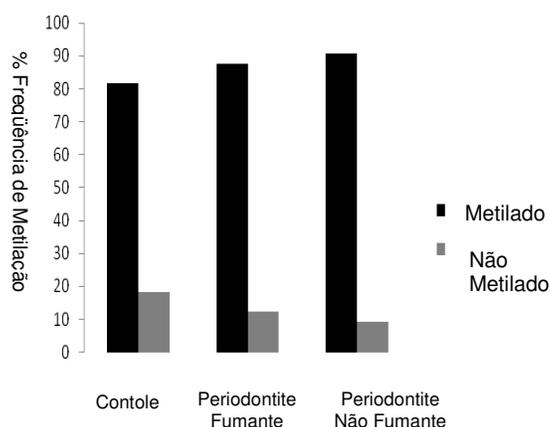


Figura 4. Frequência do padrão de metilação no promotor do gene da MMP-3 (posição - 686) em células epiteliais de mucosa bucal de indivíduos saudáveis e com periodontite crônica fumantes e não-fumantes.

Tabela 4. Distribuição do padrão de metilação no promotor do gene da MMP-3 (posição - 686) em células epiteliais de mucosa bucal nos grupos estudados. ($p=0,2960$)

	Controle (n = 82)	Periodontite Fumante (n = 40)	Periodontite Não Fumante (n = 72)
Metilado	67	35	65
Não Metilado	15	05	07

Nas células de tecido gengival a taxa de desmetilação foi maior em todos os grupos de forma homogênea e também não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos. A frequência do padrão desmetilado correspondeu a 28% dos indivíduos do grupo controle, 38% dos indivíduos do grupo periodontite fumantes e 27% dos indivíduos do grupo periodontite não-fumantes ($p=0,79$, χ^2 teste) (Figura 5 e Tabela 5).

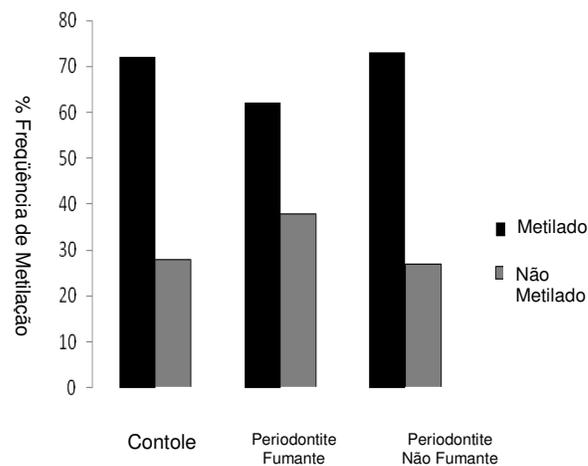


Figura 5. Frequência do padrão de metilação no promotor do gene da MMP-3 (posição - 686) em células de tecido gengival de indivíduos saudáveis e com periodontite crônica fumantes e não-fumantes

Tabela 5. Distribuição do padrão de metilação no promotor do gene da MMP-3 (posição - 686) em células de tecido gengival dos três grupos analisados. ($p=0,79$)

	Controle (n = 14)	Periodontite Fumante (n = 13)	Periodontite Não Fumante (n = 18)
Metilado	10	08	13
Não Metilado	04	05	05

Embora a análise da expressão relativa do RNAm da MMP-3 por PCR em tempo real tenha sido maior no grupo periodontite não-fumante, esta diferença não foi significativa entre os grupos estudados ($p= 0,2716$, *Kruskal-Wallis* teste). A figura 6 mostra gráfico contendo a média da expressão para MMP-3 e o gráfico com desvio padrão das amostras encontrada nos grupos.

A análise da correlação entre padrão de metilação no DNA e expressão gênica não mostrou diferença entre os grupos para o gene da MMP-3 ($p \geq 0,05$, Coeficiente de Spearman).

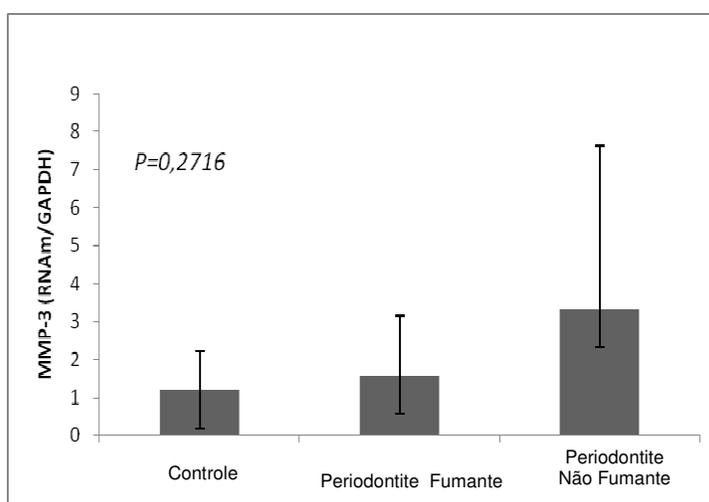
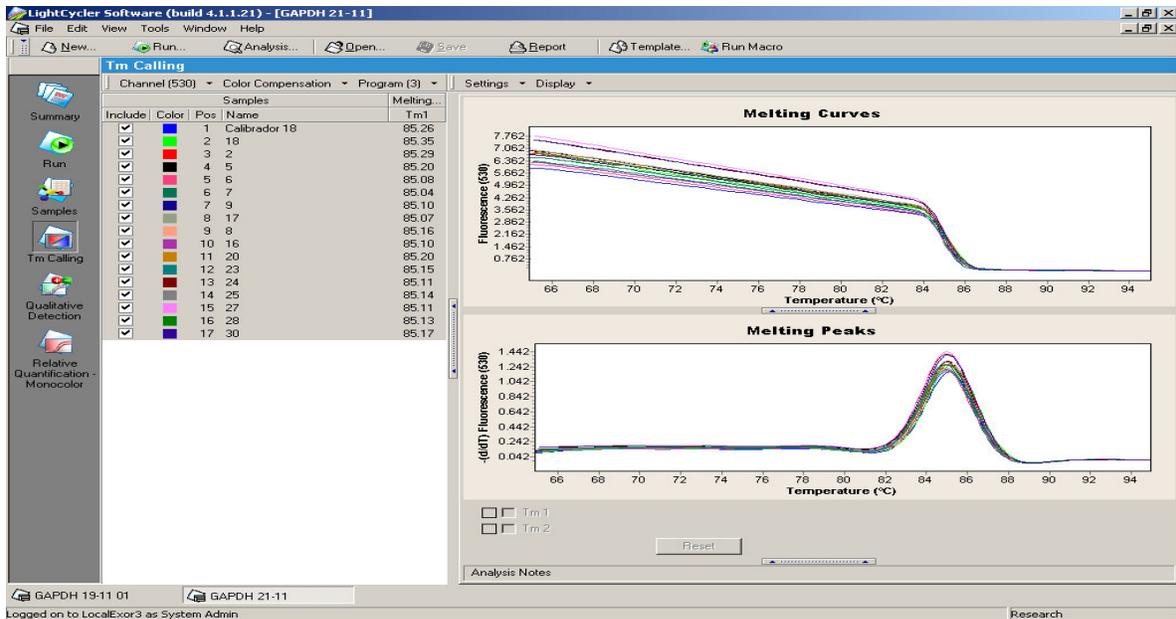


Figura 6. Média e desvio padrão da expressão da MMP-3 presente nos grupos estudados. Uma amostra pertencente ao grupo periodontite não-fumante apresentou maior desvio padrão e esta foi removida.

A) GAPDH



B) MMP-3

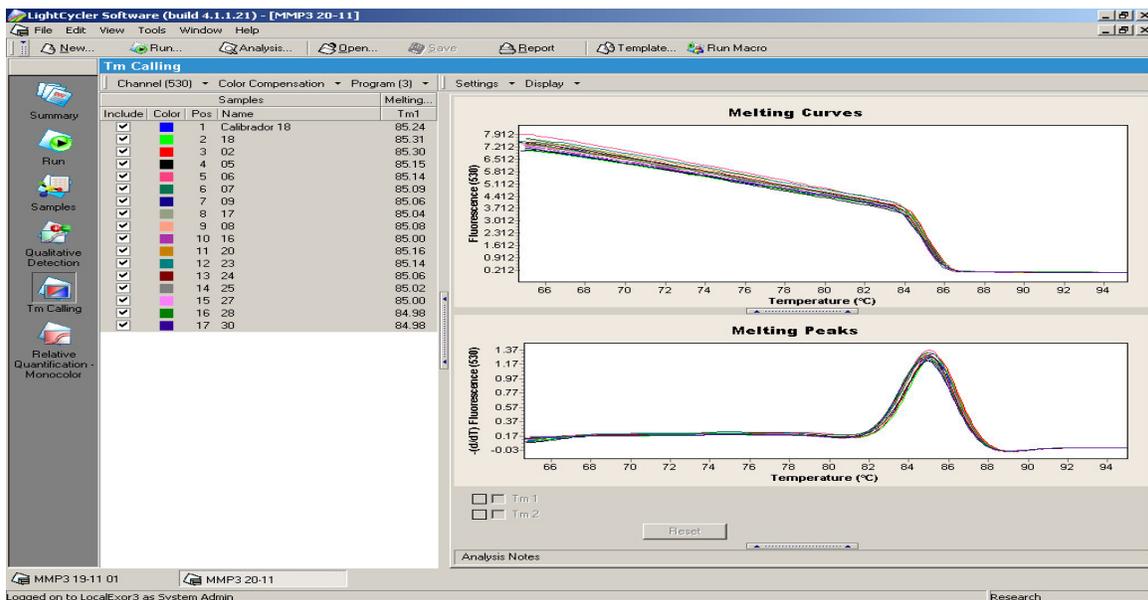


Figura 7. Gráficos da expressão relativa no Real Time PCR. A) GAPDH; B) MMP-3. Observar que a curva de Melting mostra a especificidade das reações.

6 DISCUSSÃO

Mudança no perfil epigenético representa um mecanismo central no desenvolvimento de muitas doenças humanas, incluindo o câncer. Dinucleotídeos CpG potencialmente “metiláveis” não estão randomicamente distribuídos pelo genoma, aparecem em regiões isoladas ou em regiões onde se concentram e são denominados ilhas CpG. Geralmente estas ilhas estão presentes no promotor de muitos genes que normalmente estão desmetilados em células normais (Esteller, 2007). O gene selecionado para investigação neste estudo foi escolhido pelo seu reconhecido papel na patogênese da periodontite. Porém, o promotor da enzima MMP-3 não tem como característica a presença destas ilhas CpG, os sítios CpGs aparecem esparsos pelo promotor deste gene.

A análise de padrão de metilação em promotores que apresentam sítios CpG esparsos é um tanto negligenciada, dando-se mais valor à análise de múltiplos sítios. Embora a proteína MeCP1 que se liga ao grupo metil requeira múltiplos sítios CpG próximos entre si para se ligar e assim promover a condensação da cromatina para a forma inativa, a proteína MeCP2 pode se ligar a apenas um simples sítio CpG, promovendo alterações na cromatina semelhantes às promovidas pela proteína MeCP1. A interação de um único sítio CpG com elementos *enhancers* potentes que estão muitas vezes muito distante do promotor pode também ser suficiente para promover alteração na transcrição genética (Bird, 1986). Até o momento, não se sabe se os promotores das enzimas da família das MMPs possuem elementos *enhancers* potentes (Roach *et al.*, 2005).

Estudos têm mostrado que metilação de dinucleotídeos CpG deve ser um mecanismo importante no controle da atividade do promotor do gene das estromelinas. Ensaios *in vitro* mostraram que a metilação do promotor da MMP-3 foi capaz de suprimir completamente a atividade transcripcional deste promotor. Por outro lado, a ablação genética dos genes das DNA metiltransferases *Dnmt-1* e *Dnmt-3b* ou a inibição destas enzimas pelos inibidores 5-aza-dC e Zebularmina induziram a expressão da MMP-3 e MMP-10 (Couillard *et al.*, 2006).

Alteração no padrão de metilação no promotor do gene da MMP-3 (posição -635 e -686), MMP-9 (posição -36) e MMP-13 (posição -110) em condrócitos de articulações afetadas pela osteoartrite foi reportada por Roach e colaboradores (2005). A osteoartrite é uma doença inflamatória que promove a degeneração das cartilagens articulares. Semelhante a periodontite é caracterizada pela presença de elevados níveis de MMP-3 e MMP-9 nos tecidos, onde estas enzimas desempenham um papel importante na degradação de moléculas extracelulares como, por exemplo, colágenos II, IX e XI e proteoglicanos. Neste estudo os autores encontraram uma forte correlação entre presença de sítios metilados e silenciamento da expressão da MMP-3 em condrócitos saudáveis e desmetilação associada à elevada expressão da MMP-3 em condrócitos afetados pela osteoartrite.

Em nosso estudo não foi possível verificar correlação direta entre presença/ausência de metilação na posição analisada e taxa de expressão. Isto pode ter ocorrido devido à riqueza de tipos celulares diferentes existentes no tecido gengival. Enquanto o tecido cartilaginoso é formado apenas por condrócitos que devem apresentar um padrão epigenético quase idêntico, a gengiva apresenta células residentes diferentes e células sanguíneas que migraram para o tecido, que devem apresentar perfis epigenéticos diferentes, e isto pode ter camuflado uma possível correlação.

Ainda, não podemos descartar modificações epigenéticas em outros sítios CpGs mais importantes no promotor da MMP-3. Tanto em indivíduos controle quanto em indivíduos afetados o promotor do gene da MMP-3 não está necessariamente completamente metilado ou completamente desmetilado como poderíamos supor inicialmente (Roach *et al.*, 2005). O sítio CpG na posição -686 esteve desmetilados em indivíduos controle e indivíduos afetados pela periodontite, o que faz pensar que esta posição pode não ser fundamental no controle da transcrição da MMP-3.

A conformação tridimensional da cromatina em certas regiões do DNA também poderia influenciar neste padrão. O mecanismo epigenético é um

processo que requer a participação de enzimas, no caso da metilação das DNA metiltransferases. Estas enzimas ativas necessitam de uma fonte doadora de grupamentos químicos CH₃ para atuarem sobre dinucleotídeos CpG acessíveis. O acesso a estes dinucleotídeos nem sempre é tão fácil, sendo modulado pela condensação da cromatina. Assim, genes transcritos em determinadas células poderiam estar mais suscetíveis a estas alterações, uma vez que a cromatina na região transcrita torna-se menos condensada e a dupla fita de DNA se separa, tornando-se momentaneamente fita simples para que ocorra a transcrição, estando o acesso ao DNA facilitado à ação enzimática no geral.

A influência do tabaco neste resultado não é totalmente clara. Outros estudos também obtiveram resultados inconclusivos sobre o risco do tabaco na predisposição às alterações epigenéticas em câncer de pulmão (Guo *et al.*, 2004).

Sendo a periodontite uma doença infecciosa devemos ainda ressaltar a relação entre a microbiota local e alterações no padrão de metilação que tem sido reportada em algumas doenças. Um dos melhores exemplos é a associação entre a presença da bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e alterações no padrão de metilação em câncer gástrico. A infecção por *H. pylori* aumenta o risco ao desenvolvimento de tumores na mucosa gástrica e esta infecção tem sido associada com alterações epigenéticas em genes importantes para o desenvolvimento de tumores, incluindo metilação no gene *CDH1* que expressa a proteína E-caderina (Ushijima, 2007).

Terminando, fugimos intencionalmente do foco para discutimos uma questão ainda sem resposta concreta, mas intrigante. No início deste estudo pensávamos em encontrar alterações no padrão de metilação associadas com a maior suscetibilidade e/ou severidade da inflamação periodontal. Entretanto, hoje pensamos que existe uma possibilidade do inverso ocorrer. A inflamação desencadilharia alterações neste padrão devido às alterações geradas no microambiente celular, e isto poderia estar muito próximo de eventos associados à formação de tumores.

O tema inflamação *versus* carcinogênese é polêmico havendo na literatura diversas revisões sobre o assunto, muitas delas indicando uma íntima relação na trajetória dos dois eventos (Coussens & Werb 2002). Na década de cinqüenta, Slaughter e colaboradores afirmaram que o epitélio da mucosa apresenta o que eles chamaram de “*field cancerization*” muito antes do aparecimento do tumor, sendo isto demonstrado pela primeira vez em câncer bucal. Atualmente sabe-se que estes campos apresentam defeitos genéticos e epigenéticos, que já foram diagnosticados em mucosa de estômago (Maekita *et al.*, 2006), colon (Shen *et al.*, 2005), esôfago de Barret (Eads *et al.*, 2000), epitélio de pulmão (Guo *et al.*, 2004), fígado (Kondo *et al.*, 2000), rim (Arai *et al.*, 2006) e em glândulas mamárias (Yan *et al.*, 2006). Se isto é fato, permanece ainda a dúvida sobre o papel da irritação crônica promovida pela inflamação nestes tecidos no surgimento destes defeitos celulares.

7 CONCLUSÕES

- A. Nossos resultados mostram que o padrão de metilação encontrado na posição -686 do promotor do gene da MMP-3 não apresentou diferença entre os grupos com o periodonto saudável e com periodontite crônica fumante e não fumante

- B. Também não houve diferença nos níveis de expressão de RNAm da MMP-3 em indivíduos com periodonto saudável ou com periodontite crônica fumantes ou não-fumantes, não sendo possível verificar correlação direta entre presença/ausência de metilação na posição analisada e taxa de expressão

REFERÊNCIAS*

Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J.* 2007; 18(2):148-52.

Akgul C, Edwards SW. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60(11): 2402-8.

Arai E, Kanai Y, Ushijima S, Fujimoto H, Mukai K, Hirohashi S. Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding nontumorous renal tissues. *Int J Cancer.* 2006; 119(2): 288-96.

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59(2): 241-57.

Autio-Harminen H, Karttunen T, Hurskainen T, Höyhty M, Kauppila A, Tryggvason K. Expression of 72 kDa type IV collagenase (gelatinase A) in benign and malignant ovarian tumors. *Lab Invest.* 1993; 69(3): 312-21.

Bagaitkar J, Demuth DR, Scott DA. Tobacco use increases susceptibility to bacterial infection. *Tob Induc Dis.* 2008; 4(1): 12.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

Bagaitkar J, Williams LR, Renaud DE, Bemakanakere MR, Martin M, Scott DA *et al.* Tobacco-induced alterations to Porphyromonas gingivalis-host interactions. Environ Microbiol. 2009. [Epub ahead of print].

Baragi VM, Brott DA, Qiu L, Conroy MC, Lalwani ND. Immunofluorescence quantitation of stromelysin in human synovial fibroblasts by confocal laser scanning microscopy. Lab Invest. 1995; 72(4): 484-90.

Bender J. DNA Methylation And Epigenetics. Annu. Rev. Plant Biol. 2004; 55: 41–68.

Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature. 1986; 321(6067): 209-13.

Birkedal-Hansen, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. J Periodontal Res. 1993a; 28(6): 500-10.

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinase in human periodontal diseases. J Periodontol. 1993b; 64(5 Suppl): 474-84.

Bostrom L, Bergstrom J, Dahlen G, Linder LE. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. J Clin Periodontol. 2001; 28(3): 212-9.

Chin JR; Murphy G; Werb Z. Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. J Biol Chem. 1985; 260(22): 12367-76.

Choi DH, Kim EM, Son HJ, Joh TH, Kim YS, Kim D *et al.* A novel intracellular role of matrix metalloproteinase-3 during apoptosis of dopaminergic cells. *J Neurochem.* 2008;106(1): 405-15.

Couillard J, Demers M, Lavoie G, St-Pierre Y. The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 342(4): 1233-9.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420(6917): 860-7.

Darby L, Hodge P, Riggio M, Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early onset patients by polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol.* 2000; 27(6): 417-24.

Dhasarathy A, Wade PA. The MBD protein family—Reading an epigenetic mark? *Mutat. Res.* 2008; 647(1-2): 39-43

De Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, De Brito Jr RB, Line SRP. MMP-1 promoter polymorphism: association with chronic periodontitis severity in a Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(2): 154-8.

De Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, DE Brito RB, Line SR. Analysis of the TGF-B1 promoter polymorphism (C –509T) in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(6): 519-23.

Dioszegi M, Cannon P, Van Wart H. Vertebrate Collagenases. *Methods Enzymol.* 1995; 248: 413-31.

Domagala-Kulawik J. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity, *J Physiol Pharmacol.* 2008; 59(6): 19-34

Eads CA, Lord RV, Kurumboor SK, Wickramasinghe K, Skinner ML, Long TI *et al.* Fields of aberrant CpG islands hypermethylation in Barrets's esophagus and associated adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2000; 60(18): 5021-6.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007; 08(4): 286-98.

Fini ME, Cook Jr, Mohan R, Brinckerhoff CE. Regulation of matrix metalloproteinases gene expression. In: Parks WC, Mecham RP. (Editores), *Matrix Metalloproteinases.* California: Academic Press; 1998. p. 299-356.

Fukushige S, Kondo E, Horii A. Methyl-CpG targeted recruitment of p300 reactivates tumor suppressor genes in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 379(4): 1021-6.

Gabriel HE, Crott JW, Ghandour H, Dallal GE, Choi SW, Keyes MK *et al.* Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(4): 835-41.

Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases, *J Periodontol.* 2008; 79(8): 1592-600

Gross J, Nagai Y. Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962; 54(4):1197-203.

Guo M, House MG, Hooker C, Han Y, Heath E, Gabrielson E *et al.* Promoter hypermethylation of resected bronchial margins: a field defect of changes? *Clin Cancer Res.* 2004; 10(15): 5131-136.

Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microflora. *J Clin Periodontol.* 2001; 28(5): 377-88.

Henikoff S, Matzke MA. Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends Genet.* 1997; 13(8): 293-5.

Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J, Werb Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous dodecyl. *Chemistry.* 1986; 261(6): 2814-18.

Hibbs M.S.; Bainton, D.F. Human neutrophil collagenase is a component of specific granules. *J Clin Invest.* 1989; 84(2): 1395-402.

Hollá LI, Jurajda M, Fassmann A, Dvorakova N, Znojil V, Vacha J. Genetic variations in the matrix metalloproteinase-1 promoter and risk of susceptibility and/or severity of chronic periodontitis in the Czech population. *J. Clin. Periodontol.* 2004; 31(8): 685-90.

Hodge DR, Peng B, Cherry JC, Hurt EM, Fox SD, Kelley JA *et al.* Interleukin-6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. *Cancer Res.* 2005; 65(11): 4673-82.

Howard EW, Bullen EC, Banda MI. Preferential inhibition of 72 and 92 kDa gelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem.* 1991; 266(20): 13070-5.

Humphries SE, Bauters C, Meirhaeghe A, Luong L, Bertrand M, Amouyel P. The 5A6A polymorphism in the promoter of the stromelysin (MMP3) gene as a risk factor for restenosis. *Eur Heart J.* 2002; 23(9): 721-5.

Hoppmann P, Koch W, Schömig A, Kastrati A. The 5A/6A polymorphism of the stromelysin-1 gene and restenosis after percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J*. 2004; 25(4): 335-41.

Itagaki M, Kubota T, Tai H, Shimada Y, Morozumi T, Yamazaki K. Matrix metalloproteinase-1 and -3 gene promoter polymorphisms in Japanese patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(9): 764-9.

Jeziarska A, Motyl T. Matrix Metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Med Sci Monit*. 2009; 15(2): RA32-40

Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol* 2004; 75(2): 196-209.

Julovi SM, Yasuda T, Shimizu M, Hiramitsu T, Nakamura T. Inhibition of interleukin-1beta-stimulated production of matrix metalloproteinases by hyaluronan via CD44 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 2004; 50(2): 516-25.

Kanai Y. Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers. *Pathol Int*. 2008; 58(9): 544-58.

katono T, Kawato T, Tanabe N, Suzuki N, Yamanaka K, Oka H *et al*. Nicotine treatment induces expression of matrix metalloproteinases in human osteoblastic Saos-2 cells. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2006; 38(12): 874-82.

Kenny HA & Lengyel E. MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis. *Cell Cycle*. 2009; 8(5): 683-8.

Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science*. 1998; 280(5365): 898-902.

Knauper V, Osthues A, Declerck YA, Langley KE, Bläser J, Tschesche H. Fragmentation of human polymorphonuclear-leucocyte collagenase. *Biochem J*. 1993; 291(3): 847-54.

Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Mizokami M, Ueda R, Hirohashi S. Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis-A comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2000; 32(5): 970-9.

Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*. 2008; 79(8): 1560-8.

Kotake S, Nanke Y, Yago T, Yamanaka H. Rheumatoid arthritis in the context of bone and cartilage. Serum markers of synovitis and bone metabolism in rheumatoid arthritis. *Clin Calcium*. 2009; 19(3): 362-71.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Câncer*. 2003; 3(4): 253-66.

Laxman VK, Annaji S. Tobacco use and its effects on the periodontium and periodontal therapy. *J Contemp Dent Pract*. 2008; 9(7): 97-107

Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 2002; 18(11): 1427-31.

Linden GJ, Mullaly BH. Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults. *J Periodontol.* 1994; 65(7): 718-23.

López-Otín C E, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(10): 800-8

Lorencini M, Silva JA, De La Hoz CL, Carvalho HF, Stach-Machado DR. Changes in MMPs and inflammatory cells in experimental gingivitis. *Histol Histopathol.* 2009; 24(2): 157-66

Macfarlane G, Herzberg M, Wolff L, Hardie NA. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking. *J Periodontol.* 1992; 63(11): 908-13.

Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M *et al.* High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(3 pt 1): 989-95.

Magnusson I, Walker CB. Refractory periodontitis or recurrence of disease. *J Clin Periodontol.* 1996; 63(11): 289-92.

Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.* 1990; 6(4): 121-5.

Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs, *Cell* 58(1989) 499–507

Medley TL, Kingwell BA, Gatzka CD, Pillay P, Cole TJ. Matrix metalloproteinase-3 genotype contributes to age-related aortic stiffening through modulation of gene and protein expression. *Circ Res.* 2003; 92(11): 1-8.

Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'shea M, Ward R, Atkinson S *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994; 732: 31-41.

Miller MC, Manning HB, Jain A, Troeberg L, Dudhia J, Essex D *et al.* Membrane type 1 matrix metalloproteinase is a crucial promoter of synovial invasion in human rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 2009; 60(3): 686-97.

Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(12): 2108-14.

Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N *et al.* Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase/ gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest.* 1995; 72(3): 311-22.

Opdenakker G, Den Steen PEV, Dubois B, Nelissen I, Coillie Ev, Masure S *et al.* Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol.* 2001; 69(6): 851-9.

Overall CM. Molecular determinantes of metalloproteinase substrate specificity. Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. *Mol Biotechnol.* 2002; 22(1): 51-86.

Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. *Periodontol 2000*. 1997; 14: 9-11.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott Da. Mechanisms of action of environmental factors – tobacco smoking. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(6): 180-95.

Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann. Periodontol*. 1996; 1(1): 1-36.

Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(8): 617-29.

Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol*. 2007; 26(8): 587-96.

Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K. High expression of 92- kDa type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol*. 1994; 124(6): 1091-102.

Reponen P, Sahlberg C, Huhtala P, Hurskainen T, Thesleff I, Tryggvason K. Molecular cloning of murine 72-kDa type IV collagenase and its expression during mouse development. *J Biol Chem*. 1992; 267(11): 7856-62.

Roach HI, Yamada N, Cheung KSC, Tilley S, Clarke NMP, Oreffo ROC, *et al*. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum*. 2005; 52(10): 3110-24.

Russo AL, Thiagalingam A, Pan H, Califano J, Cheng KH, Ponte JF *et al*. Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stage-specific

tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(7): 2466-70.

Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 173-201.

Sanguinetti CJ, Dias-Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994; 17(5): 914-21.

Santos MCL, Campos MIG, De Souza AP, Trevilatto PC, Line SRP. Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphism in early osseointegrated implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004; 19(1): 38-43.

Sato N, Maehara N, Su GH, Goggins M. Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. *Journal of the J Natl Cancer Inst.* 2003; 95(4): 327-30.

Saus J, Quinones S, Otani Y, Nagase H, Harris ED Jr, Kurkinen M. The complete primary structure of human matrix metalloproteinase-3. Identity with stromelysin. *J Biol Chem.* 1988; 263(14): 6742-5

Schenkein HA, Gunsolley JC, Koertge TE, Schenkein JG, Tew JG. Smoking and its effects on early-onset periodontitis. *J Am Dent Assoc.* 1995; 126(8): 1107-13.

Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J *et al.* MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(18): 1330-8.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953; 6(5): 963-8.

Schumacher A, Kapranov P, Kaminsky Z, Flanagan J, Assadzadeh A, Yau P *et al*. Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(2): 528-42.

Scott DA, Palmer RM, Stapleton JA. Validation of smoking status in clinical research into inflammatory periodontal disease. A review. *J Clin Periodontol*. 2001; 28(8): 715-22.

Shuto T, Furuta T, Oba M, Xu H, Li Jd, Cheung J *et al*. Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *FASEB J*. 2006; 20(6): 782-4

Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE *et al*. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell*. 1997; 1(1): 25-34.

Souza AP, Gerlach RF, Line SRP. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater*. 2000; 16(2): 103-8.

Souza LB. Estudo morfométrico e bioquímico da atrofia da glândula parótida do rato provocada por ligadura do ducto excretor principal. [tese]. Bauru: FOB-USP, 1989.

Sternlicht MD, Lochter A, Sympon CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW *et al*. The stromal proteinase MMP3/Stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell*. 1999; 98(2): 137-46.

Stricklin GP, Jeffrey JJ, Roswit WT, Eisen AZ. Human skin fibroblast procollagenase: mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. *Biochemistry*. 1983; 22(1): 61-8.

Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet*. 2004; 36(5): 497-501.

Tonetti MS. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. *Ann. Periodontol*. 1998; 3(1): 88-101.

Trevilatto PC, Line SRP. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000; 18(1): 6-9.

Uria JA, Jimenez MG, Balbin M, Freije JM, Lopez-Otin C. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem*. 1998; 273(16): 9769-77.

Ushijima T. Epigenetic Field for Cancerization. *J Biochem Mol Biol*. 2007; 40(2): 142-50.

Van Der Velden U, Varoufaki A, Hutter J, Xu L, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ *et al*. Effect of smoking and periodontal treatment on subgingival microflora. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(7): 603-10.

Van Den Borne SW, Cleutjens JP, Hanemaaijer R, Creemers EE, Smits JF, Daemen MJ *et al*. Increased matrix metalloproteinase-8 and -9 activity in patients with infarct rupture after myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol*. 2009;18(1): 37-43

Van Wart He, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinases activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. PNAS USA. 1990; 87(14): 5578-82.

Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. Mol Cell. 1997; 1(1): 13-23.

Von Zeidler SV, Miracca EC, Nagai MA, Birman EG. Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. Int J Mol Med. 2004; 14(5): 807-11.

Walker EJ, Rosenberg GA. TIMP-3 and MMP-3 contribute to delayed inflammation and hippocampal neuronal death following global ischemia. Exp Neurol. 2008; 216(1): 122-31.

Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, Ayabe T, Lopez-Boado YS, Stratman JL. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate hostdefense. Science. 1999; 286(5437): 113-7.

Wilson AG. Epigenetic Regulation of Gene Expression in the Inflammatory Response and Relevance to Common Diseases. J Periodontol. 2008; 79(8): 1514-9

Weeks JG, Halme J, Woessner JF Jr. Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. Acta Biochim Biophys. 1976; 445(1): 205-14.

Welgus H.G. Fliszar CJ Seltzer JL, Schmid TM, Jeffrey JJ. Differential susceptibility of type IV collagen to cleavage by two mammalian interstitial collagenases an 72-kDa type IV collagenase. J Biol Chem. 1990; 265(23): 13521-7.

Woessner JF Jr. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 732: 31-41.

Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science.* 1999; 286(5439): 481-6.

Yan PS, Venkataramu C, Ibrahim A, Liu JC, Shen RZ, Diaz NM *et al.* Mapping geographic zones of cancer risk with epigenetic biomarkers in normal breast tissue. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(22): 6626-36.

Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 2000; 19(7): 623-9.

Zeilhofer HU, Schorr W. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Curr. Opin. Hematol.* 2000; 7(3): 178-82.

ANEXO 1

TERMO DE INFORMAÇÃO E CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA CIENTÍFICA

ANÁLISE DE METILAÇÃO NO DNA E DE TRANSCRIÇÃO GENÉTICA DOS GENES IL-8, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 E TIMP-2, TIMP-3 EM CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL E SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS FUMANTES E NÃO-FUMANTES COM PERIODONTITE CRÔNICA

1. INTRODUÇÃO: Leia este termo cuidadosamente, pois as informações a seguir irão descrever esta pesquisa e a sua função nela como participante. Caso tenha qualquer dúvida sobre este estudo ou termo, você deverá esclarecê-la com os pesquisadores responsáveis pelo trabalho que estarão apresentando este termo a você: Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo e/ou mestranda Gilcy R. Damm do Depto. de Morfologia da FOP/UNICAMP; Fone: (19) 2106-5214

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO DA PESQUISA: Esta pesquisa terá como objetivo estudar a capacidade do cigarro em provocar modificações em nosso DNA (a molécula que guarda nossa genética) para tentar explicar porque a pessoa que fuma tem maiores chances em desenvolver problemas de gengiva que possam levar à perda dos dentes. Para tanto, será necessário coletar o material que durante o tratamento fica retido no instrumental do dentista e também será necessário coletar amostra de sangue venoso. O sangue será coletado utilizando agulha descartável e tubo descartável próprio para coleta de sangue (material igual ao utilizado para tirar sangue em laboratório de análise). **Você deve decidir se deseja ou não colaborar com esta pesquisa, entendendo-a o suficiente para fazer uma decisão consciente.** No laboratório este material será analisado por uma técnica chamada de *MSP-PCR* que identifica alterações químicas no DNA (o material coletado do paciente). Se alterações forem encontradas, elas não irão significar doença, apenas variações entre os indivíduos que pré-dispõe ao problema na gengiva.

DESCRIÇÃO DOS PARTICIPANTES: Irão participar deste estudo pacientes do sexo feminino e masculino, adulto com idade entre 25 e 60 anos, fumantes (+ 5 cigarros/dia) e não-fumantes (nunca fumaram), que apresentam doença periodontal crônica em grau moderado a severo e que estejam em tratamento periodontal na Clínica de Especialização em Periodontia da FOP-UNICAMP. Não haverá nenhum custo adicional ao paciente decorrente da pesquisa.

DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS: Serão coletadas células do instrumental do dentista e 10 mL de sangue venoso da veia radial. O sangue servirá como material controle do indivíduo. No laboratório, o DNA destas células será purificado e analisado por uma técnica chamada de *MSP-PCR*. Esta técnica detecta

possíveis alterações químicas que tenham ocorrido no DNA das células. Os resultados encontrados nas células de indivíduos fumantes e não fumantes serão então comparados para sabermos se existem diferenças.

DESCONFORTO, RISCOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS: Os procedimentos da pesquisa não geram riscos significativos à saúde do paciente. A coleta do material presente no instrumental não gera desconforto ou risco adicional ao indivíduo uma vez que este material é obtido durante o tratamento periodontal (instrumentação). A coleta de sangue não gera riscos graves, mas poderá ser considerada desconfortável para o paciente devido à dor da “picada” da agulha, possibilidade de surgimento de hematomas e equimoses. Esta coleta será realizada por profissional capacitada para coleta de sangue (a mestrandia Gilcy Raymundo Damm, formada em Biomedicina) e em local apropriado. O paciente e o cirurgião dentista responsável pelo tratamento poderão se beneficiar com a possibilidade de receber o diagnóstico genético previsto na pesquisa. Porém, o voluntário poderá optar abaixo em receber ou não este diagnóstico. O tratamento proposto não será modificado, mas o paciente poderá ser aconselhado sobre os possíveis malefícios que o fumo esteja causando no DNA de suas células. O maior benefício esperado será a melhor compreensão dos eventos moleculares e dos mecanismos que tomam o fumo um agente de risco à gengiva e periodonto. Uma vez conhecido este mecanismo, novas estratégias terapêuticas poderão ser abordadas para tratar e até mesmo prevenir a destruição do periodonto. O paciente será mais bem esclarecido sobre os malefícios do cigarro e potenciais riscos a que se expõe com o hábito de fumar através de folheto explicativo e/ou palestra educativa.

- Sim, desejo receber meu diagnóstico genético
- Não, não desejo receber meu diagnóstico genético

ALTERNATIVAS: Realizar coleta somente do material retido no instrumental do dentista. Porém a não coleta do sangue frustrara os resultados e as conclusões finais esperadas na pesquisa uma vez que o sangue será o material controle individual utilizado na pesquisa.

EXCLUSÕES: Pacientes com história de diabetes; mulheres grávidas ou em lactação; pessoas com história de hepatite ou infecção por HIV, história de sangramento ou discrasias sanguínea, ou com pré-medicação antibiótica recente ou uso crônico de drogas antiinflamatórias serão excluídos da pesquisa, pois estes fatores mascaram os dados analisados. Caso no decorrer da pesquisa se identifique pacientes com estes perfis que ainda não se encontrem em tratamento, estes serão encaminhados para tratamento competente.

CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS: A identificação das amostras será realizada utilizando números. Os resultados desta pesquisa serão apresentados em congressos científicos, porém a identidade dos participantes não será divulgada nessas apresentações, o mesmo ocorrendo em eventuais publicações. Os resultados identificados somente serão liberados ao voluntário e ao dentista responsável pelo tratamento, se de acordo com a vontade do voluntário.

DIREITO DE PARTICIPAR, RECUSAR OU SAIR: Sua participação neste estudo é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda dos benefícios aos quais de outra forma tenha direito.

ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA E GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS: Os voluntários poderão ter acesso ao andamento da pesquisa e serão esclarecidos sempre que necessário sobre dúvidas a respeito da pesquisa no telefone de contato das pesquisadoras Ana Paula de Souza Pardo ou Gilcy Raimundo Damm abaixo informados.

GARANTIA DE RESSARCIMENTO, INDENIZAÇÃO E REPARAÇÃO DE DANOS: Sempre que o voluntário necessitar vir até a FOP/UNICAMP exclusivamente devido à pesquisa será ressarcido com seus gastos com transporte no valor referente ao passe de ônibus (ida e volta). Não prevemos nenhum dano ou risco ao paciente decorrente da pesquisa e portanto, não há previsão de indenização.

BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO: Este material poderá ser utilizado para pesquisa de outros genes em outras pesquisas, mas você será comunicado e novo TCLE será obtido.

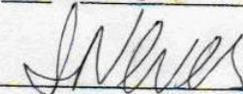
VOCÊ ESTARÁ RECEBENDO UMA CÓPIA DESTE TERMO ASSINADA POR VOCÊ E POR UM DOS PESQUISADORES RESPONSÁVEIS.

CONTATOS: Em caso de dúvida sobre a pesquisa, entrar em contato com a Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo e/ou a aluna de pós-graduação Gilcy Raimundo Damm no departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, Av. Limeira 901 Piracicaba-SP fone: (019) 2106-5214

Em caso de dúvida sobre seus direitos como voluntário, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOP/Unicamp, secretária Leny Cecília Faro Pereira Rosilho, Fone (019) 2106-5349, Home Page www.fop.unicamp.br/cep, E-mail: cep@fop.unicamp.br

Recebi informações para participação em pesquisa científica que me foi explicado dentro da minha compreensão. Também tirei minhas dúvidas sobre este estudo com o pesquisador até minha completa satisfação. Sei que minha participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento sem penalidade e sem prejudicar ou influenciar os resultados do estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento e também autorizo a liberação dos dados obtidos da pesquisa aos pesquisadores e para publicação em revistas científicas e congressos. **Não assine este termo se não teve a oportunidade de solucionar suas dúvidas e recebido respostas satisfatórias a todas elas.**

Piracicaba, 26 de set de 2007

X 
Assinatura do paciente, RG, Telefone para contato

ANEXO 2

Sangue:
Bochecho:
Gengiva:

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP

Nº amostra: _____

Nome: _____

Sexo: F M Idade: _____ Cor: M P B

Endereço: _____

Cidade: _____ Profissão: _____

Tel: _____ CEL: _____

DADOS CLÍNICOS SOBRE SAÚDE GERAL

Doença Crônica? S N (não aceitar diabetes) Qual? _____

Diabete na família? S N

Fumante? S N

Fumante Passivo? S N

Quantos cigarros por dia? _____ (mínimo 5)

Há quanto tempo fuma? _____ (mínimo 5)

DADOS PERIODONTAIS

Quantos dentes? _____

Direito

Esquerdo

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

Maior Sondagem: _____ (mínimo 5 mm)

Histórico

Câncer? S N Qual? _____

Câncer na Família? S N Qual? _____

Freqüência de Doença Periodontal _____

Doença Periodontal na família? S N Freqüência _____

Fumante na Família? S N

OBSERVAÇÕES:

Estado periodontal: leve () moderado () avançado ()

Sangramento Gengival S N

Tártaro: S N



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Análise de metilação no DNA e de transcrição genética dos genes IL-8, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-2, TIMP-3 e iNOS em células do ligamento periodontal e sangue periférico de indivíduos fumantes e não-fumantes com periodontite crônica", protocolo nº 172/2006, dos pesquisadores ANA PAULA DE SOUZA PARDO, GILCY RAYMUNDO DAMM e NAILA FRANCIS PAULO DE OLIVEIRA, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 13/12/2006.

Piracicaba, 20 de junho de 2007

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Analysis of DNA methylation and genetic transcription of IL-8, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-2, TIMP-3 and iNOS genes in periodontal ligament cells and blood cells of smoking and no-smoking subjects with chronic periodontitis", register number 172/2006, of ANA PAULA DE SOUZA PARDO, GILCY RAYMUNDO DAMM and NAILA FRANCIS PAULO DE OLIVEIRA, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 13/12/2006. 20/06/2007.

Piracicaba, SP, Brazil, June 20 2007


Prof. Cinthia Pereira Machado Tabchoumy

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Jacks Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.