



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Naila Francis Paulo de Oliveira

**ANÁLISE DE METILAÇÃO NO PROMOTOR DOS GENES *IL8*, *TLR2*
E *TLR4* EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL E
CÉLULAS DO TECIDO GENGIVAL DE INDIVÍDUOS FUMANTES E
NÃO FUMANTES COM PERIODONTITE CRÔNICA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Biologia Buco-Dental, área de concentração Histologia e Embriologia.

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-8ª. / 6159

OL4a	Oliveira, Naila Francis Paulo de. Análise de metilação no promotor dos genes IL8, TLR2 e TLR4 em células epiteliais da mucosa bucal e células do tecido gengival de indivíduos fumantes e não fumantes com periodontite crônica. / Naila Francis Paulo de Oliveira. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009. Orientador: Ana Paula de Souza Pardo. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Interleucina. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. RNA. 4. Tabaco. I. Pardo, Ana Paula de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
------	---

Título em Inglês: DNA methylation analysis of the IL8, TLR2 and TLR4 gene promoters in oral mucosa cells and gingival tissue of smokers and non-smokers subjects with chronic periodontitis

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Interleukin. 2. Polymerase Chain Reaction. 3. RNA. 4. Tobacco

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

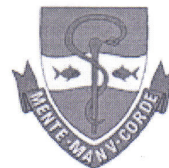
Banca Examinadora: Ana Paula de Souza Pardo, Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, Paula Cristina Trevilatto, Ricardo Della Coletta, Marcelo Rocha Marques

Data da Defesa: 19-11-2009

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 Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 19 de Novembro de 2009, considerou a candidata NAILA FRANCIS PAULO DE OLIVEIRA aprovada.

Profa. Dra. ANA PAULA DE SOUZA PARDO

Profa. Dra. MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS

Profa. Dra. PAULA CRISTINA TREVILATTO

Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

Prof. Dr. MARCELO ROCHA MARQUES

Agradecimento Especial

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Paula de Souza Pardo, por ter me mostrado um mundo novo dentro da Biologia, pela confiança e por ser exemplo de ética e respeito. Agradeço imensamente.

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 Buco-Dental da FOP/UNICAMP, pela seriedade na condução do Curso.

Ao CNPQ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão da bolsa que possibilitou a execução deste trabalho.

À Suzete e Joelma, pela atenção junto à secretaria do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP.

À Érica, Raquel, Débora e Roberta, secretárias da Pós-Graduação, pelo auxílio durante todo o curso, e principalmente nos momentos finais.

À Eliene e Gustavo pelo auxílio técnico no laboratório de Histologia.

Ao Prof. Dr. Sergio Roberto Peres Line, pelos ensinamentos, pela confiança e pelo exemplo de ética e respeito.

Aos meus pais, Áurea e Wasny, por serem sempre meu porto seguro, e por tornarem tudo isso possível.

Às minhas irmãs, Suelen, Danila e Maira, e vó Quina pelo incentivo e carinho e aos meus sobrinhos Didé, Guigui e Nati que são os meus grandes amores.

Ao meu marido Rofson, por todos esses anos de partilha de vida e por me fazer querer ser uma pessoa melhor.

Aos amigos de longa data: Lu, Simone, Renato, Marcelinho, Ana Luíza, Dani, Fubá, Estela e Sérgio pelos momentos de diversão.

Às meninas do laboratório: Aline, Denise, Gilcy, Gláucia, Luciana, Mariana, Marisi, Liza e Simone que tornam o dia-a-dia mais leve.

Ao Marcelo e Crica pelos ensinamentos e amizade.

RESUMO

A doença periodontal crônica é caracterizada pela inflamação e destruição dos tecidos periodontais, podendo levar à perda dos dentes. Está claro que a periodontite é influenciada pela genética do hospedeiro, constituição do biofilme bucal e o hábito de fumar. Sabe-se que a interleucina 8 (IL-8) é a principal molécula atrativa de neutrófilos. Essas células são as primeiras a chegar aos locais inflamados e além de realizar fagocitose, participam também da destruição do tecido periodontal. Sabe-se também que os patógenos que causam a periodontite são reconhecidos por proteínas receptoras de membrana denominadas receptores *Toll-like* (TLR), que uma vez acionados iniciam a resposta imune inata. *IL8* e *TLRs* são expressos constitutivamente por células bucais e estão superexpressos na periodontite. Em particular, a IL-8 está ainda aumentada em indivíduos com periodontite crônica fumantes. A expressão gênica é controlada por diferentes mecanismos, incluindo a metilação de DNA. A metilação em dinucleotídeos CpG presentes em promotores de genes inibe a expressão do gene, podendo silenciar por completo a expressão gênica. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o padrão de metilação no DNA nas regiões promotoras dos genes *IL8*, *TLR2* e *TLR4* em células bucais e sanguíneas de indivíduos com periodontite crônica fumantes e não fumantes. Também, analisar os níveis de transcritos destes genes quando encontrado diferença no padrão de metilação entre os grupos, a fim de associar o padrão de metilação com a transcrição gênica. Amostras de DNA foram purificadas de células da mucosa bucal, de tecido gengival e tecido sanguíneo de indivíduos saudáveis e com periodontite crônica fumantes e não fumantes. A metilação no gene *IL8* foi investigada pela transformação com bissulfito de sódio seguida pela técnica de PCR Específica para Metilação. A análise de metilação nos genes *TLR2* e *TLR4* foi realizada utilizando o método de Digestão Enzimática Sensível à Metilação. Após o tratamento pelo bissulfito de sódio (IL8) ou digestão enzimática (TLRs), DNA foi amplificado por PCR, submetido à eletroforese em gel de poliácridamida 10% corado pelo SYBR Gold. Os níveis de transcritos foram analisados utilizando PCR Quantitativo. A análise estatística foi realizada pelo teste de χ^2 e Kruskal-Wallis para metilação e expressão gênica, respectivamente. A correlação entre metilação *versus* expressão foi realizada a partir do teste de coeficiente não linear de Spearman. Os resultados indicam que para células epiteliais da mucosa bucal, a frequência de desmetilação no gene da *IL8* é maior no grupo periodontite crônica, independente do hábito de fumar, em comparação ao grupo saudável ($p<0,0001$). Não foram detectadas diferenças no padrão de metilação no tecido gengival e sanguíneo entre os grupos. Foram encontrados maiores níveis de transcritos de IL-8 no grupo periodontite em comparação ao grupo saudável ($p=0,007$), entretanto, não há relação entre o padrão de metilação e expressão gênica ($p>0,05$). Para o gene *TLR2*, não foram detectadas diferenças no padrão de metilação entre os grupos em nenhum tecido estudado ($p>0,05$). Para o gene *TLR4*, foi encontrada massiva desmetilação na mucosa bucal e para tecido gengival a desmetilação foi ainda maior, principalmente dentro do grupo periodontite ($p=0,03$).

Palavras-chave: DNA, epigenética, metilação, inflamação, periodontite, IL-8, TLR

ABSTRACT

Chronic periodontal disease is characterized by inflammation and destruction of periodontal tissues, culminating in teeth loss. It is clear that periodontitis is influenced by host genetic, biofilm, and smoking habit. There are some important molecules involved on the pathogenesis of periodontitis. Interleukin (IL-8) is responsible for inducing chemotaxis, which is the directed migration of neutrophil to a site of inflammation. Neutrophil contributes to the elimination of the infecting bacteria and tissue destruction. Infecting bacteria are recognized by transmembrane receptors called Toll-like receptors (TLR), which recognized molecular pattern of microorganisms. The recognition of a variety of microorganisms components by individual TLRs induces innate immune responses. *IL8* and *TLRs* are constitutively expressed by buccal cells and they are upregulated during periodontitis. Genetic transcription is regulated by different pathways, including DNA methylation. Methylation in CpG dinucleotides of gene promoters downregulates the levels of transcription and may even silence the gene transcription completely. So, the objective of this study was to analyze the pattern of DNA methylation in the promoter region of *IL8*, *TLR2* and *TLR4* genes in oral cells and blood tissue from healthy subjects and subjects with chronic periodontitis smokers and non-smokers. We also investigated the levels of mRNA expressed when different methylation status were found among groups. DNA samples were purified from buccal mucosa, gingival tissue and blood tissue of healthy subjects and subjects with chronic periodontitis smokers and non-smokers. Methylation of *IL8* gene was investigated using sodium bisulphite modification followed by Methylation Specific PCR. Methylation analysis of *TLRs* genes were performed using *Specific Methylation-Sensitive Restriction Enzymes*. After sodium bisulphite modification (*IL8*) or enzymatic digestion (*TLR2* and *TLR4*), DNA was amplified by PCR and the results were visualized after electrophoresis on 10% polyacrylamide gels stained by SYBR Gold. Levels of mRNA were analysed using Real Time PCR. The statistical analysis was performed using the test of χ^2 and Kruskal-Wallis test for methylation status and gene expression, respectively. The correlation among methylation status *versus* gene expression was performed using no linear coefficient test of Spearman. The results indicate that frequency of *IL8* gene demethylation is higher in individuals with chronic periodontitis, independent of smoking habit, than healthy group ($p<0.0001$). Differences were not detected in the methylation status in gingival tissue and blood tissue among the groups. Higher levels of IL-8 mRNA are expressed in periodontitis group than healthy group ($p=0.007$), however, we did not observe a relationship between *IL8* gene methylation and gene expression. No significant difference was observed for *TLR2* gene promoter among groups in all studied tissues ($p>0.05$). *TLR4* gene promoter showed massive demethylation in oral mucosa and for gingival tissue it was even higher, mainly in periodontitis group ($p=0.03$).

Key words: DNA, epigenetic, methylation, inflammation, periodontitis, IL-8, TLR

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	-	por cento
χ^2	-	qui-quadrado
°C	-	grau Celsius
Mg	-	micrograma
μ L	-	microlitros
μ M	-	micromolar
A	-	adenina
AP-1	-	proteína ativadora 1
C	-	citossina
cDNA	-	DNA complementar
CDH1	-	gene da E-caderina
CpA	-	citossina/ ligação fosfodiéster/ adenina
CpC	-	citossina/ ligação fosfodiéster/ citossina
CpG	-	citossina/ ligação fosfodiéster/ guanina
CpT	-	citossina/ ligação fosfodiéster/ timina
CXCR	-	receptor de quimiocina
DNA	-	ácido desoxirribonucléico
DNMT	-	DNA metiltransferase
FGF	-	fator de crescimento de fibroblastos
GAPDH	-	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
h	-	hora
HPV	-	papiloma vírus humano
IFN	-	interferon
IL-8	-	interleucina 8
IL	-	interleucina
IL-1 β	-	interleucina 1 beta
LPS	-	lipopolissacarídeo
M	-	molar
MBP	-	<i>Methyl binding protein</i>

MeCP	-	<i>Methyl cytosine binding protein</i>
Min	-	minuto
mL	-	mililitro
MMP	-	metaloproteinase da matriz
mRNA	-	RNA mensageiro (ácido ribonucleico mensageiro)
MyD88		fator de diferenciação mielóide 88
NF- κ B	-	fator nuclear de transcrição KappaB
ng	-	nanograma
Oct-1	-	proteína ligante de octâmero 1
OD	-	densidade óptica
pb	-	pares de bases
PCR	-	reação em cadeia de polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
Primer	-	oligonucleotídeo iniciador
RPM	-	rotações por minuto
RT-PCR	-	reação de transcrição reversa em tempo real
SAM	-	S-adenosilmetionina
SIGRR	-	receptor único de Ig1 relacionado IL-1
TBE	-	tampão tris-borato-EDTA (ácido diamino tetracético)
TLR	-	receptor Toll-like
TNF α	-	fator de necrose tumoral alfa
U	-	unidade
5-MeC	-	5-metilcitosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	03
	2.1 Periodontite crônica e o hábito de fumar cigarro.....	03
	2.2 Interleucina-8.....	05
	2.3 Receptores Toll-like.....	07
	2.4 Epigenética.....	09
	2.5 Metilação na molécula de DNA.....	12
3	PROPOSIÇÃO.....	18
4	MATERIAL É MÉTODOS.....	19
	4.1 Seleção da amostra.....	19
	4.2 Coleta das amostras.....	20
	4.3 Extração de DNA.....	21
	4.4 Extração de RNA.....	22
	4.5 Análise de metilação no promotor do gene <i>IL8</i>	23
	4.6 Análise de metilação no promotor dos genes <i>TLR2</i> e <i>TLR4</i>	24
	4.7 Sequenciamento do gene <i>IL8</i>	27
	4.8 Análise de expressão de <i>IL8</i>	27
	4.9 Análise estatística.....	28
5	RESULTADOS.....	30
	5.1 <i>IL8</i>	30
	5.2 <i>TLR2</i> e <i>TLR4</i>	35
6	DISCUSSÃO.....	41
7	CONCLUSÕES.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	ANEXO 1.....	64
	ANEXO 2.....	65
	ANEXO 3.....	69
	ANEXO 4.....	71

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a maior causa de perda dental nas sociedades ocidentais é a periodontite (Nanci & Bosshardt, 2006). A periodontite (ou doença periodontal) é uma doença inflamatória que afeta os tecidos de suporte dos dentes (o periodonto, composto pelo osso alveolar, pelo ligamento periodontal e pelo cimento) e que da fase aguda pode torna-se crônica. Está claro que a composição do biofilme bacteriano que se instala sobre a superfície dos dentes representa o fator que inicia e promove a doença, porém sua progressão é dependente de outros fatores, tais como a condição de saúde sistêmica do indivíduo, a presença de hábitos de risco à doença, como fumar cigarros, e composição genética e epigenética do hospedeiro (Kornman, 2008). Juntos estes fatores determinarão o chamado “fenótipo clínico” do hospedeiro (Offenbacher *et al.*, 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 (Meyer *et al.*, 2008). 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). Os componentes químicos do cigarro aumentam a predisposição para alterações genéticas e epigenéticas, como alteração do padrão de metilação no DNA, nas células que estão em contato direto com os agentes químicos da fumaça do cigarro, entre elas, as células da mucosa bucal (Gabriel *et al.*, 2006).

A interleucina-8 (IL-8) representa a mais potente quimiocina com a função de recrutar células inflamatórias, principalmente polimorfonucleares, para o tecido inflamado. Dentre as células inflamatórias, os neutrófilos são um dos primeiros a serem quimioatraídos pela ação da IL-8 e a migrar da corrente sanguínea para os locais da inflamação. Estas importantes células do contexto inflamatório liberam

dos seus grânulos citoplasmáticos fatores bactericidas e proteases, entre elas a MMP-9, participando na primeira linha de defesa da inflamação (Remick, 2005).

Outras proteínas importantes, que participam tanto da resposta imune inata quanto adaptativa são os receptores chamados Toll-like (TLR). Os TLRs representam proteínas receptoras de membrana plasmática que atuam como sensores no reconhecimento de vários patógenos (Hornet & Bogdan, 2005). Os TLRs possuem papel chave na periodontite, uma vez que esta doença é disparada por microrganismos, tais como *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que apresentam lipopolissacarídeos (LPS) em suas paredes, e que são reconhecidos pelos TLRs. A família de receptores Toll-Like é composta por vários membros, entretanto, TLR-2 e TLR-4 representam os mais potentes no reconhecimento de lipopolissacarídeos derivados de microrganismos (Akira & Takeda, 2004). Os receptores Toll-like participam também da sinalização para ativação do gene da interleucina-8 (Medzhitov & Janeway, 2000a).

Assim, uma vez que as proteínas IL-8, TLR-2 e TLR-4 desempenham papel importante na patogênese da doença periodontal crônica, o objetivo deste estudo foi analisar o padrão de metilação no promotor dos genes que codificam estas proteínas em células epiteliais da mucosa bucal e células do tecido gengival de indivíduos fumantes e não fumantes com periodontite crônica, e relacionar com o nível dos transcritos desses genes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Periodontite Crônica e o Hábito de Fumar Cigarro

A periodontite é iniciada e mantida pelo biofilme bacteriano que contém centenas de espécies bacterianas diferentes, não havendo uma espécie identificada como sendo a principal no desenvolvimento da periodontite. Porém, a causa da doença é complexa e multifatorial, relacionada com a resposta imuneinflamatória do hospedeiro, desencadeada pelo biofilme bacteriano, que gera alterações na homeostase do tecido conjuntivo e tecido ósseo, e influenciada por fatores de risco que agravam a doença. Dentre estes fatores, podemos citar o cigarro.

O mecanismo pelo qual, o tabaco, e outros componentes presentes na composição dos cigarros promovem efeitos deletérios sobre os tecidos periodontais e mucosa bucal há décadas é investigado. 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).

A periodontite é frequentemente mais grave em indivíduos que fumam quando comparada com indivíduos ex-fumantes, estando os menores riscos entre pessoas que nunca fumaram. O risco estimado para o desenvolvimento de periodontite é de 2,5 a 7 vezes maior em indivíduos fumantes do que em não fumantes (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 do biofilme e tratamento, a resposta à terapia é pobre. Geralmente nestes casos os indivíduos são fumantes massivos (MacFarlane *et al.*, 1992; Magnusson & Walker, 1996; 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 subgengival durante a periodontite encontraram pouca ou nenhuma diferença significativa entre as espécies bacterianas observadas em fumantes e não fumantes (Darby *et al.*, 2000; Bostrom *et al.*, 2001; van der Velden *et al.*, 2003). Já outros autores identificaram diferença entre a microflora oral subgengival em fumantes e não fumantes (Haffajee & Socransky, 2001), havendo ainda dúvidas sobre esta questão.

O fumo promove alterações na vascularização do tecido gengival. Tais alterações ocorrem possivelmente devido à 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 consequências 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 sanguíneos observados clinicamente e também histologicamente (Palmer *et al.*, 2005).

O cigarro altera direta e indiretamente a função dos neutrófilos. O fumo provoca aumento na síntese de algumas citocinas da inflamação, entre elas, o TNF- α e IL-8. Neutrófilos expressam receptores celulares para estas citocinas e sabe-se que os antagonistas naturais destas moléculas estão desregulados em indivíduos fumantes (Zeilhofer & Schorr, 2000; Akgul & Edwards, 2003). Assim, a resposta dos neutrófilos quando estimulados pelo TNF- α e IL-8 está modificada, havendo exacerbação da resposta em fumantes. A fumaça do tabaco também modifica a atividade proteolítica dos neutrófilos. O recrutamento de neutrófilos para o periodonto aumenta os níveis de metaloproteinase e elastase locais. Evidências têm mostrado também que o fumo pode alterar o *turnover* do colágeno, diminuindo a síntese de colágeno e elevando a síntese de metaloproteinases

(Palmer *et al.*, 2005). Estas enzimas exercem importante papel na degradação dos tecidos periodontais.

Entretanto, muito pouco é conhecido a respeito das alterações químicas que os componentes do cigarro podem provocar na molécula do DNA das células do periodonto e quais os efeitos que possam surtir destas possíveis alterações.

2.2 Interleucina 8 (IL-8 ou CXCL8)

Células inflamatórias são intensamente recrutadas para tecidos inflamados em um processo chamado quimiotaxia celular e as responsáveis por este fenômeno são moléculas mediadoras da inflamação liberadas nos locais inflamados, como: leucotrienos, fragmentos bacterianos e citocinas inflamatórias.

Entre as citocinas, a IL-8 é a que melhor representa o protótipo capaz de promover quimiotaxia celular. IL-8 é membro da família de α -quimiocinas e também conhecida pela sigla *CXCL8*, nomenclatura derivada da estrutura proteica onde *CXC* significa dois resíduos de cisteína interpostos pelo resíduo de outro aminoácido qualquer (exceto cisteína) e *L* significa que a molécula representa um ligante (Remick 2005). Seu gene está localizado no cromossomo 4q13-q21, sendo constituído por quatro exons e três íntrons. A região 5' do gene apresenta sequências "TATA" e "CAT" e potenciais sítios de interação para fatores de transcrição nucleares, como fator de ativação 1 e 2, fator regulador de IFN, elementos responsáveis a glicocorticóides e *heat shock element*.

Praticamente toda célula nucleada do corpo humano produz IL-8, incluindo monócitos, macrófagos, células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos gengivais (Standiford *et al.*, 1990). Múltiplos estímulos podem levar a célula a produzir IL-8, incluindo bactérias e lipopolissacarídeos (LPS), mas sua expressão é potencializada pelas citocinas inflamatórias IL-1 β e pelo TNF- α .

Uma vez sintetizada, a IL-8 é liberada na matriz extracelular na forma de uma molécula precursora inativa de 77 aminoácidos, sendo ativada por clivagem proteolítica que resulta em um polipeptídeo de 72 aminoácidos (Remick, 2005). Produzida nos primeiros instantes da inflamação, pode persistir no local inflamado

por longos períodos que vão de dias a semanas (DeForge *et al.*, 1992), em contraste com outras citocinas que são produzidas e imediatamente removidas do local inflamado em um processo rápido que dura apenas horas. Possui afinidade pelos receptores de membrana CXCR1 e CXCR2, receptores com configuração em forma de “serpentina”, com sete passagens e acoplados a uma proteína G reguladora (Remick, 2005).

A IL-8 é um potente quimioatraente de neutrófilos, a célula chave responsável pelo processo inflamatório agudo. Assim, não é surpresa encontrar quantidades elevadas de IL-8 nos fluidos corpóreos durante a fase aguda do processo inflamatório em várias doenças, incluindo fluido expectorante em asmáticos (Chanez *et al.*, 1996), fluido sinovial na artrite (Remick *et al.*, 1992) e fluido gengival durante gengivite e periodontite. Entretanto, níveis elevados de IL-8 podem persistir também na inflamação crônica. Alta quantidade de proteína e RNAm da IL-8 tem sido encontrada em tecido gengival e fluido gengival de indivíduos com periodontite crônica, o que nos leva a acreditar na importância desta citocina no desenvolvimento e na manutenção da periodontite crônica (Yucel-Lindberg & Brunius, 2006).

Além da função exercida sobre os neutrófilos, IL-8 parece também atuar como fator angiogênico. Esse papel favorece a criação de um novo suplemento vascular nos tecidos afetados pela infecção e inflamação, melhorando a remoção de resíduos metabólicos celulares, necessário para que haja eficiente eliminação de microrganismos invasores e reparação do local afetado. O mecanismo exato pelo qual a IL-8 promove a angiogênese ainda não está totalmente claro. Alguns pesquisadores reportam um efeito direto da IL-8 sobre as células endoteliais enquanto outros descrevem um efeito indireto (Kumar *et al.*, 1998; Murdoch *et al.*, 1999). Na ação indireta, os neutrófilos que migraram em resposta a IL-8 e que liberaram no tecido proteases e heparanase promovem hidrólise de componentes da matriz extracelular. Durante este processo, a elastase derivada dos neutrófilos, ativa proteases latentes da matriz que então clivam e inativam o inibidor do ativador de plasminogênio, o inibidor natural da plasmina (Bjornland *et al.*, 1998;

Foekens *et al.*, 2003). Durante esta remodelação, ocorre a liberação de fatores de crescimento como o FGF, um potente fator angiogênico que também possui função de quimioatração de células endoteliais (Vlodavsky *et al.*, 1991; Bashkin *et al.*, 1989). Estes eventos associados à saída dos neutrófilos da corrente sanguínea (que durante o seu extravasamento formam canais de escape nas paredes dos vasos) promovem a migração de células endoteliais para o local afetado, possibilitando assim a criação de uma nova rede vascular neste local.

A IL-8 está envolvida também em processo que leva à destruição de matriz extracelular. Após migração, os neutrófilos liberam o conteúdo de seus grânulos no tecido, uma série de enzimas, incluindo a enzima proteolítica MMP-9. Esta enzima pertence à família das metaloproteinases da matriz (MMP), que são responsáveis por mediar a degradação/remodelação da matriz extracelular. Uma vez liberada, a MMP-9 cliva a IL-8 dando origem a um polipeptídeo menor e mais potente (Opdenakker *et al.*, 2001). Desta forma, se instala um sistema de *feedback* positivo que exacerba o processo de quimiotaxia e destruição tecidual. Além disto, neutrófilos liberam fatores responsáveis pela ativação de MMPs latentes produzidas por outras células, como a MMP-2, o que favorece a degradação do tecido.

2.3 Receptores Toll-like (TLRs)

O sistema immune reconhece produtos microbianos conservados, denominados padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), que são um diverso grupo de moléculas presentes nos microrganismos. PAMPs são reconhecidos por um grupo de receptores incluindo os receptores Toll-like (TLRs) (Aderem & Ulevitch, 2000; Hornef & Bogdan, 2005). Pelo menos dez membros já foram identificados em humanos, e cada membro reconhece um PAMP específico. Alguns anos atrás, o protótipo da proteína *Toll* de *Drosophila* — uma proteína receptora transmembrana que foi inicialmente mostrada como controladora do padrão de desenvolvimento dorso-ventral do embrião — foi também associada à resposta antifúngica em moscas adultas (Gay & Keith, 1991). Desde então, dez

homólogos da proteína Toll foram identificados em humanos, os quais contêm um domínio extracelular rico em leucina e um domínio citoplasmático conservado, contendo regiões semelhantes à cadeia dos receptores IL-1R, IL-18R SIGIRR e MyD88, assim denominados regiões homólogas Toll/IL-1R. Dados genéticos e bioquímicos suportam uma via de sinalização comum que finalmente leva à ativação de NF- κ B (Medzhitov & Janeway, 2000b).

Estudos têm mostrado que o TLR-2 reconhece principalmente peptideoglicanos e lipopeptídeos (Akira & Takeda, 2004) e o TLR-4 reconhece lipopolissacarídeos (Yoshimura *et al.*, 2002; Darveau *et al.*, 2004; Mochizuki *et al.*, 2004). TLR-2 pode ainda participar no reconhecimento de LPS e fímbrias provenientes de bactérias envolvidas na periodontite, como a *P. gingivalis* (Asai *et al.*, 2001; Hirschfeld *et al.*, 2001). Já o TLR-4, além de reconhecer LPS de *P. gingivalis*, participa também do reconhecimento de LPS de *A. actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* (Yoshimura *et al.*, 2002; Darveau *et al.*, 2004; Mochizuki *et al.*, 2004). Esta última é uma bactéria que está presente também no periodonto saudável, entretanto em menores proporções em relação ao periodonto inflamado.

O reconhecimento de LPS pelo TLR-2 ainda é controverso. Um recente estudo mostrou que o mesmo LPS pode ser reconhecido por TLR-2 ou TLR-4. Esse estudo utilizou LPS de *P. gingivalis* e constatou que células epiteliais o reconheceram via TLR-2 e células endoteliais via TLR-4 (Kocgozhu *et al.*, 2009).

Os TLRs são expressos por muitos tipos celulares diferentes, componentes do sistema imune inato, incluindo: macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais (Mahanonda *et al.*, 2007). Em relação às células bucais, os receptores Toll-like 2 e 4 são constitutivamente expressos por células da mucosa e tecido gengival (Uehara *et al.*, 2002; Kusumoto *et al.*, 2004; Uehara & Takada, 2007). Os genes *TLR2* e *TLR4* estão localizados nos cromossomos 4q32 e 9q32-q34 respectivamente. Alguns estudos têm mostrado que ambos os receptores são ainda mais expressos em células epiteliais bucais (Uehara *et al.*, 2002) e células epiteliais não bucais (Kikkert *et al.*, 2007) quando

induzidos por LPS. Alguns autores mostraram que *TLR2* e *TLR4* são altamente expressos em tecidos gengivais obtidos de indivíduos com periodontite crônica em comparação com indivíduos com gengivite (Kajita *et al.*, 2007). Estudos recentes mostraram por imunocitoquímica que todos os receptores Toll-like, exceto TLR-10, são expressos por células do tecido gengival (Beklen *et al.*, 2008) e que a expressão destes é mais forte nas células de tecido gengival proveniente de indivíduos com periodontite crônica *versus* indivíduos saudáveis (Beklen *et al.*, 2009).

Uma vez acionado, o receptor Toll-like media uma sinalização induzindo transdução de sinais, levando à transcrição de genes de citocinas e quimiocinas que iniciam a resposta imune inata e que são críticas para o controle da inflamação tecidual, homeostase local e apresentação de antígenos (Akira *et al.*, 2001).

2.4 Epigenética

O termo epigenética surgiu na metade do século 20 após estudos correlacionando bases genéticas e embriológicas. Conrad Waddington (1942), estudioso dessas duas ciências, foi o primeiro a perceber a relação entre elas e acreditou que deveriam de alguma forma, ser estudadas em conjunto. Surgiu então a epigenética, nome derivado do termo grego *epigenesis* que descreve uma teoria da biologia do desenvolvimento que propõe que embriões em estágios iniciais são indiferenciados.

A importância dos estudos de Waddington reside na relação estabelecida entre genes, atividade genética e desenvolvimento, durante um período no qual o intercâmbio das informações geradas por geneticistas e pesquisadores da biologia do desenvolvimento não acontecia adequadamente. Com o tempo, tornou-se claro que alguns aspectos fundamentais do desenvolvimento precisavam de explicações. Um deles era entender como células diferenciadas como fibroblastos ou linfócitos mantinham estáveis seus fenótipos após a divisão celular. Isso significava que genes relacionados com a especialização de determinados

fenótipos celulares permaneciam “ligados” enquanto outros genes, ativos em outros tipos celulares, deveriam permanecer “desligados” e, de maneira lógica, esses controles celulares teriam que ser herdados após a divisão da célula.

Tradicionalmente herança refere-se à transmissão de genes de uma geração à outra ou de uma célula-mãe para uma célula-filha, a chamada herança mitótica que ocorre em células de organismos superiores. Mas a partir do instante que se entende que o mecanismo de “liga-desliga” genes também é herdado, torna-se necessário acrescentar a esta definição o conceito da herança da atividade gênica. Em células-tronco de organismos superiores a herança da atividade gênica assume proporções ainda mais complexas, já que estas representam células indiferenciadas que se dividem produzindo outra célula indiferenciada ou se dividem produzindo células já diferenciadas. No caso das células-tronco da medula óssea, uma variedade de tipos celulares sanguíneos é produzida, e nessa situação, está claro que ocorre uma troca de atividade gênica associada com a divisão celular.

Outro exemplo é o cromossomo X de fêmeas de mamíferos eutérios. No desenvolvimento inicial dessas fêmeas um dos cromossomos X é aleatoriamente inativo em todas as células, enquanto o outro cromossomo X se mantém ativo. Se esses dois cromossomos possuem praticamente a mesma sequência de DNA e residem no mesmo local, então se acredita que a diferença na atividade gênica deva ser intrínseca ao próprio cromossomo e independente da sequência de bases presentes. A inativação do cromossomo X também difere entre as células, sendo ora inativado o herdado materno, ora o herdado paterno. Assim, fica evidente que ocorre uma troca na inativação do cromossomo X durante o desenvolvimento inicial e esta troca é aleatória, permanente e herdável em células que sofrerão mitose.

Se a herdabilidade ocorre, e não está envolvida com a sequência de bases no DNA, qual o mecanismo pelo qual isto acontece? A explicação poderia residir em alterações químicas associadas a histonas e DNA. A primeira sugestão de que uma modificação química em bases do DNA poderia desempenhar importante

papel biológico foi publicado em 1969 por Griffith & Mahler. Um pouco mais tarde, estudos independentes mostraram um modelo molecular para a troca de atividade gênica e também a herdabilidade da atividade ou inatividade gênica (Riggs, 1975; Holliday & Pugh, 1975). Esses autores sugeriram que a metilação da molécula de DNA poderia ter fortes efeitos na expressão gênica, e as alterações no padrão de metilação do DNA poderiam explicar como genes estão “ligados” ou “desligados” em diferentes tipos celulares e como o sistema “liga-desliga” dos genes ocorre durante o desenvolvimento.

A identificação de uma enzima capaz de reconhecer DNA hemimetilado após a replicação e não atuar em DNA não metilado esclareceu a questão sobre o mecanismo para a herdabilidade do DNA metilado e não metilado e ainda, a herdabilidade de um padrão de atividade gênica.

Um pouco mais tarde, foi mostrado também por outros autores que a progressão de tumores malignos poderia estar associada com mudanças no padrão de metilação do DNA da célula tumoral, devido a aberrantes alterações na distribuição de 5-metilcitosina em células cancerosas, o que resultaria na mudança da expressão gênica. Entretanto, a palavra epigenética não foi usada em nenhum dos trabalhos sobre metilação de DNA e expressão gênica, possivelmente porque esse termo já tinha sido utilizado em trabalhos com contextos diferentes e o termo ainda permanecia indefinido.

Até então, os modelos propostos para metilação de DNA não tinham evidências experimentais. Foi no final da década de 70 que as evidências começaram a surgir. Contudo, o termo epigenética ainda não estava definido, mas os estudos relacionados à modificações do DNA e atividade gênica continuaram até que, em 1987, um artigo introduziu a palavra “epimutação” para descrever alterações herdáveis em genes que não apresentavam diferenças na sequência do DNA (Holliday, 1987). Esta publicação foi importante para o início do uso do termo epigenética, o qual explodiu na década de 90. Nesse período o imprinting genômico foi descoberto e novas definições de epigenética foram necessárias.

Duas definições sugeridas em 1994 excluía um ou outro aspecto, mas já estavam mais pautadas em evidências experimentais.

Muito progresso foi feito nas duas últimas décadas do século 20 relacionando metilação de DNA e expressão gênica numa variedade de contextos biológicos e o estudo experimental da epigenética foi estabelecido. Modificação do DNA não é o único objeto de estudo da epigenética, pois as histonas também podem sofrer modificações, dentre elas, metilação, fosforilação e acetilação. Dessa maneira, podemos definir epigenética como sendo o estudo das modificações do DNA e das histonas (cromatina) que são herdáveis e não alteram a sequência de bases do DNA (Henikoff *et al.*, 1997). O epigenoma, então, é dinâmico e varia de célula para célula dentro de um mesmo organismo multicelular.

Atualmente as pesquisas envolvendo metilação de DNA têm focado o estudo de genes relacionados ao desenvolvimento do câncer. Contudo, é crescente o interesse por estudos envolvendo doenças inflamatórias e, ultimamente, o fator envelhecimento tem sido investigado.

2.5 Metilação na Molécula de DNA

A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH_3) é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina que geralmente precede uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação de uma família de enzimas que recebe o nome de DNA metiltransferase (DNMT) (Fig. 1).

As DNA metiltransferases estão divididas em duas classes de representantes: aquelas envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas do DNA (Fig. 2), conhecidas como metilases de manutenção como a DNMT1, e outro grupo, responsável pela maioria dos processos de metilação *de novo*, que ocorre

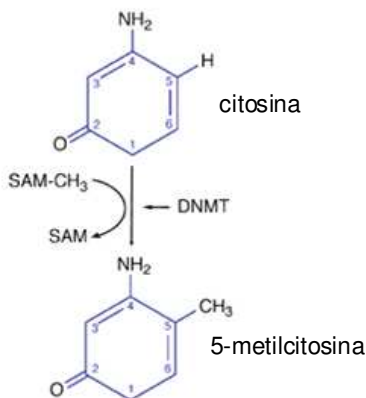


Figura 1 - Esquema do processo de formação da 5-Metilcitosina (5-MeC) pela DNA metil transferase. Fonte: Strathdee & Brown, 2002.

em sítios com nenhum tipo de indicação de metilação, ou seja, sem a presença de metilação prévia, como as DNMT2, DNMT3A e DNMT3B (Bestor, 2000). Os doadores de radical metil são obtidos pela dieta e são principalmente a metionina, seguido do folato, colina e vitamina B12 (Waterland & Jirtle, 2003; Waterland, 2006; Zeisel, 2009).

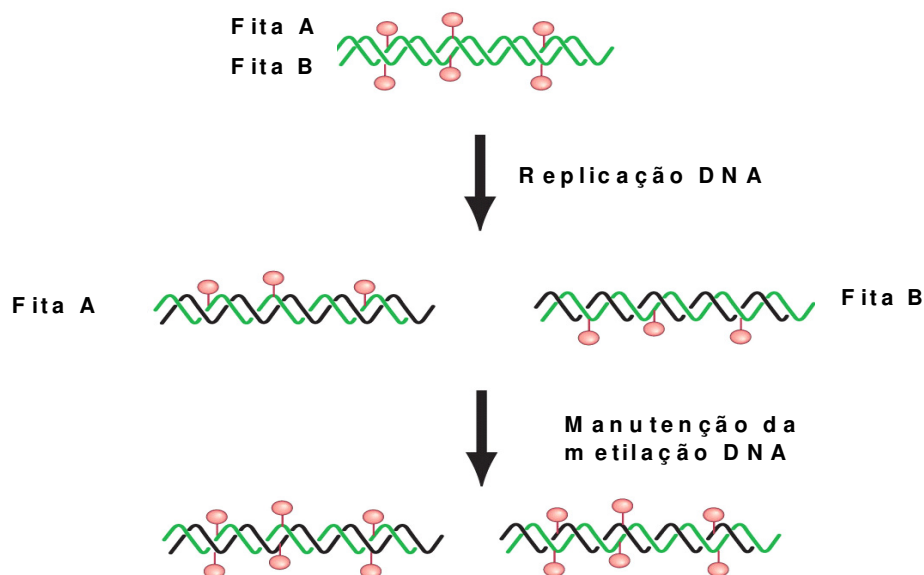


Figura 2 - Esquema mostrando a aquisição de radical metil pelas fitas-filhas. Fonte: Allis *et al.*, 2006.

Outro grupo de enzimas é responsável pela desmetilação do DNA. O processo denominado de desmetilação ativa envolve as demetilases e parece ser necessário para ativar genes específicos ou apagar a marca epigenética durante o desenvolvimento ou em respostas a perturbações ambientais. A desmetilação, ainda, pode ser passiva, quando não há envolvimento de demetilases e ocorre quando a manutenção pelas metiltransferases é inativa durante o ciclo celular (Zhu, 2009). Assim, o nível e padrão de 5-MeC são determinados por ambos os processos de metilação e desmetilação, e as enzimas envolvidas nesses processos devem estar altamente reguladas.

A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG de células diferenciadas e tem uma importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma (Feinberg & Tycko, 2004), sendo ela randômica ou sítio específica, sendo frequente em genomas de eucariotos (Poole *et al.*, 2001). Curiosamente, os pesquisadores do primeiro epigenoma recentemente sequenciado e publicado na revista *Nature* (Lister *et al.*, 2009) observaram que, em células embrionárias indiferenciadas a porcentagem de metilação em CpA, CpT ou CpC é alta e isto poderia estar relacionado com a pluripotência destas células.

Os dinucleotídeos CpG aparecem esparsos pelos genomas eucariotos ou agrupados em regiões definidas como ilhas CpG. A literatura nos mostra que a maioria dos dinucleotídeos CpG esparsos estão metilados, ao contrário das ilhas CpG que estão desmetiladas. Estas ilhas são frequentes em regiões promotoras de certos genes, incluindo genes *housekeeping*. Definindo, “ilhas CpG” são regiões do DNA maior que 200 pares de bases contendo aproximadamente 50% de bases C e G e com uma presença esperada de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG (Li & Dahiya, 2002).

Mas, recentes ensaios de microarranjos mostraram que 3-4% das ilhas CpG do genoma humano são hipermetiladas numa variedade de tecidos somáticos e isto estaria associado ao conteúdo CpG desta ilha (Weber *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2007). Assim, promotores com percentual

reduzido de nucleotídeos CpG são mais comumente vistos hipermetilados. Weber e colaboradores (2007), denominaram essas sequências com CpG reduzidas de “ilhas CpG fracas”. De acordo com esses pesquisadores, um promotor denso em CpG, também chamado de “ilha CpG forte”, contém uma área de 500 pb, com razão C/G acima de 0,75 e conteúdo de CpG acima de 55%. Ilhas CpG que apresentam um ou mais parâmetros abaixo desses são chamadas de ilhas fracas. Ainda, uma ilha fraca pode ser dividida em pequena ilha CpG se apresentar parâmetros mínimos e ilha intermediária se apresentar parâmetros intermediários.

Metilação do DNA controla várias funções do genoma. 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 à perda de função deste gene e pode ser muito mais frequente 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 a estas regiões. A figura abaixo mostra como isto pode acontecer (Fig. 3). 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 Methyl Binding Proteins (MBP), com afinidade pelo grupo metil, se ligam à dinucleotídeos CpG localizados nas regiões promotoras e impedem o acesso dos fatores de transcrição aos seus sítios (Attwood *et al.*, 2002). As primeiras MBPs foram isoladas no final dos anos 80 por Bird e colaboradores (1986). Essa família de proteínas é composta por pelo menos cinco

membros, sendo que as mais estudadas são a MeCP1 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, e a proteína MeCP2 pode se ligar a apenas um simples sítio CpG, promovendo alterações na cromatina semelhantes às promovidas pela proteína MeCP1.

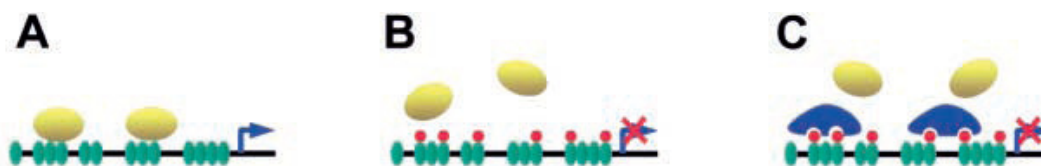


Figura 3 - Mecanismo pelo qual a metilação de DNA inibe a transcrição gênica. **A.** Região promotora desmetilada permitindo a ligação dos fatores de transcrição. **B.** Metilação impedindo a ligação dos fatores de transcrição. **C.** A presença de proteínas que se ligam à metilcitosina em ilhas CpG 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 frequente em muitos tumores humanos e têm crescido o número de genes relacionados a tumores que apresentam metilação da base citosina em sequências ricas em CG, normalmente não metiladas. 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).

Existe uma forte semelhança em eventos que ocorrem no câncer e na inflamação crônica, havendo mediadores químicos comuns aos dois processos (Valinluck & Sowers, 2007b). A associação entre polimorfismos genéticos e tumores ou doenças inflamatórias crônicas tem sido exaustivamente investigada. Do mesmo modo, a associação entre alterações epigenéticas, tumores e

inflamação deve ser estudada, uma vez que estas alterações podem propiciar o desenvolvimento de um tumor. De fato, evidências epidemiológicas de câncer derivado da inflamação, têm sido investigadas em nível molecular. Alguns estudos epigenéticos mostram que a presença da inflamação crônica no pulmão ou na mucosa gástrica está associada ao padrão de metilação aberrante em genes supressores tumorais, que por sua vez está associado ao câncer pulmonar ou gástrico respectivamente (Blanco *et al.*, 2007; Ushijima, 2007).

Padrões aberrantes de metilação podem ainda modular a inflamação. 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) e também a hipometilação do gene da MMP-3 tem sido associada com a degradação de cartilagem durante a osteoartrite (Roach *et al.*, 2005).

Além da dieta, outros fatores ambientais têm sido implicados na modulação da metilação, incluindo poluentes, tais como os íons metálicos cromo (Shiao *et al.*, 2005), cádmio (Takiguchi *et al.*, 2003) e níquel (Salnikow & Costa, 2000), além de medicamentos (Veurink *et al.* 2005) e fungicidas (Anway *et al.*, 2006). Esses fatores podem inibir ou aumentar a atividade das metiltransferases, ou ainda, afetar a cascata metabólica que leva a síntese de S-adenosilmetionina, o principal doador de radical metil (Tao *et al.*, 2000).

3. PROPOSIÇÃO

3.1- Analisar o padrão de metilação da região promotora dos genes *IL8*, *TLR2* e *TLR4* em células epiteliais da mucosa bucal e células do tecido gengival de indivíduos com periodonto saudável e indivíduos fumantes e não fumantes com periodontite crônica.

3.2- Analisar o padrão de metilação em células sanguíneas, quando diferenças no padrão de metilação são encontradas nas células bucais.

3.3- Analisar os níveis de transcritos em células do tecido gengival quando diferenças no padrão de metilação são encontradas, na tentativa de associar o padrão de metilação com a expressão gênica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 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 (indivíduos que nunca fumaram). Estes indivíduos foram recrutados da clínica de especialização em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-FOP/UNICAMP. O grupo saudável foi composto por alunos de pós-graduação e funcionários da FOP-UNICAMP e também indivíduos em tratamento nas outras clínicas de especialização da FOP-UNICAMP que não apresentavam problemas periodontais. Após triagem inicial, os indivíduos foram divididos em três grupos:

- 1) Grupo Saudável: Indivíduos não fumantes, sem sinais clínicos de inflamação dos tecidos bucais e sem perda de inserção conjuntiva ≥ 3 mm.
- 2) 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) 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. O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética FOP-UNICAMP (anexo 1). Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para a

participação voluntária na pesquisa de acordo com as normas do Comitê em Ética da Instituição (FOP/UNICAMP) (anexo 2) e preencheram uma ficha periodontal, que incluía: indivíduos não alcoólatras, sem história de diabetes, hepatite ou infecção por HPV, não gestantes ou em lactação, sem uso de prémedicação antibiótica recente e sem uso crônico de antiinflamatórios (anexo 3). Ambos os sexos foram incluídos na amostra. Foram incluídos indivíduos 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.

4.2 Coleta das amostras

Células epiteliais da mucosa bucal — As células epiteliais foram colhidas após bochecho realizado com 5mL de dextrose a 3% e centrifugadas durante 10 min a 3000 rpm para sedimentação (Trevilatto & Line, 2000).

Tecido gengival — Fragmentos de tecido gengival foram obtidos a partir de biopsias de indivíduos que estavam sob tratamento periodontal e tinham indicação de cirurgia periodontal não estética (grupos teste), ou de indivíduos que possuíam indicação de exodontia do 3º molar (grupo controle). Os fragmentos foram coletados e imediatamente armazenados em 1mL de solução conservadora de ácidos nucleicos (RNAholder, BioAgency, Brasil). Após, os tecidos foram mantidos à -70°C até o momento das análises.

Células sanguíneas — Células sanguíneas foram colhidas a partir de punção venosa de sangue periférico utilizando a veia radial. Foram utilizados tubos Vaccumtainer® com a capacidade de vácuo para coleta de 5mL de amostra, contendo EDTA como anticoagulante.

4.3 Extração de DNA

Células epiteliais da mucosa bucal — DNA genômico foi purificado utilizando acetato de amônio 8M segundo protocolo de Aidar & Line (2007). Ao final, a quantidade de DNA purificado e sua pureza foram mensuradas em aparelho de espectrofotometria utilizando a razão OD 260/280. Foram considerados puros DNAs que apresentavam a razão entre as duas leituras acima de 1,8.

Tecido gengival — Após descongelado, o líquido conservante foi removido e os tecidos foram transferidos separadamente para tubos tipo eppendorf contendo 1mL de TRIZOL (4°C) e homogeneizados por 5 min em aparelho homogeneizador de tecidos tipo Turratrec modelo MA-102 mini (Marconi Equipamnetos LTDA). Após, 0,2mL de clorofórmio (Merck) foi adicionado ao TRIZOL e a solução foi manualmente agitada com delicadeza por 5 min a 24°C, seguida por centrifugação a 14.000 rpm, a 4°C por 15 min. 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 descartado. O pellet de DNA foi lavado duas vezes com 1mL de solução contendo 0,1M citrato de sódio em etanol 10% durante 30 min e centrifugado a 2000 rpm por 5 min a 4°C. Em seguida o pellet de DNA foi seco à temperatura ambiente por 40 min, diluído em 0,3mL de tampão TE (Tris-EDTA) e armazenado a – 20°C. Ao final, a quantidade de DNA purificada e sua pureza foram mensuradas em aparelho de espectrofotometria na razão OD 260/280. Foram considerados puros DNAs que apresentaram a razão entre as duas leituras acima de 1,8.

Células sanguíneas — Sangue total foi centrifugado por 5 min a 3000 rpm para separação do plasma. Após o descarte de 1mL de plasma, foram adicionados ao sangue total 9mL de cloreto de amônia 0,144M acrescido de 1mL de bicarbonato de amônia 0,01M e mantidos por 25 min em agitação constante. Após, a amostra

foi centrifugada por 15 min a 3000 rpm e 1mL da amostra foi descartada. Seguiu-se de duas centrifugações nas mesmas condições para completa lise dos glóbulos vermelhos. Após a lise de glóbulos vermelhos, DNA genômico foi purificado utilizando acetato de amônio 8M segundo protocolo de Aidar & Line (2007). Ao final, a quantidade de DNA purificado e sua pureza foram mensuradas em aparelho de espectrofotometria na razão OD 260/280. Foram considerados puros DNAs que apresentaram a razão entre as duas leituras acima de 1,8.

4.4 Extração de RNA

Tecido gengival — Após descongelado, o líquido conservante foi removido e os tecidos foram transferidos separadamente para tubos tipo eppendorf contendo 1mL de TRIZOL (4°C) e homogeneizados por 5 minutos em aparelho homogeneizador de tecidos tipo Turratex modelo MA-102 mini (Marconi Equipamentos LTDA). Após, 0,2mL de clorofórmio (Merck) foi adicionado ao TRIZOL e a solução foi manualmente agitada com delicadeza por 5 min 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 min a 24°C, após adição de 1mL de isopropanol (Merck). Novamente o material foi centrifugado a 14.000 rpm a 4°C por 10 min 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 min. O sobrenadante foi descartado e em seguida o pellet de RNA foi seco a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida o material foi diluído em 30µl de água livre de nucleases, incubado a 56°C por 5 min e armazenado em freezer a -70°C. Ao final, a quantidade de RNA purificado e sua pureza foram mensuradas em aparelho de espectrofotometria na razão OD 260/280. Foram considerados puros RNAs com a razão entre as duas leituras acima de 1,8.

4.5 Análise de metilação no promotor do gene *IL8*

A região escolhida para análise no promotor do gene *IL8* foi submetida à análise da presença de ilhas CpG no programa *CpGPlot* disponível na página do grupo *European Bioinformatics Institute* (EMBL) (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>). Esta análise seguiu os parâmetros estipulados pelo *CpGPlot* que reconhece como ilha CpG uma região de DNA maior que 200 pb contendo pelo menos 50% de G+C e uma razão entre a frequência observada e a esperada de dinucleotídeos CG maior ou igual a 0,6. A análise pelo *CpGPlot*, indicou que o promotor da *IL8* não é composto por ilha CpG.

A análise de metilação para esse gene foi realizada utilizando o método de PCR Específica para Metilação (*Methylation Specific PCR - MSP*), cujo princípio está em transformar citosina não metilada em uracila sem provocar alteração em citosina metilada (Herman *et al.* 1996). Um µg de DNA foi desnaturado por 2µL de NaOH (0,2M) durante 20 min a 42°C, em volume total de 20µL. Após, 30µL de hidroquinona 10mM e 520µL de bissulfito de sódio 3M pH 5,0 frescos foram adicionados à mistura, e as amostras foram incubadas durante 16h a 55°C. DNA já modificado pelo bissulfito de sódio foi purificado utilizando kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* conforme protocolo do fabricante (Promega Corporations, Madison, Wi, USA) e eluído em 50µL de água livre de nucleases. As diferenças nas seqüências de DNA após tratamento com bissulfito de sódio foram detectadas pela técnica da PCR utilizando primers específicos para seqüências metiladas e não metiladas de DNA (MSP). A PCR foi realizada em volume total de 25µL contendo: 12,5µL *Go Taq Green Master Mix* (1X) (Promega Corporations, Madison, Wi, USA), 2µL do set de primers (25 µM), 1µL (~100 ng) de DNA modificado pelo bissulfito de sódio e 9,5µL de água. Fragmento de 173 pb foi amplificado utilizando a seqüência dos primers para a condição metilada (sense- 5'-aaaatttcggttatatttcg-3' / anti-sense 5'-tccgataactttttatatcat-3'), e para a condição não metilada (sense- 5'-aaaattttggttatatttg-3' / anti-sense 5'- tccaataactttttatatcat-3') que foi obtida utilizando as informações depositadas no *GenBank* (*accession number M28130*). Como controle positivo para metilação foi utilizado DNA

previamente tratado com a enzima DNA metilase. Reações num volume final de 20 μ L, continham: 2 μ L de tampão, 0,1 μ L de SAM (doador de radical metil), 0,5 μ L (3U) de SssI CpG metilase (New England Biolabs, Mississauga, ON, USA), 1 μ L de DNA e água. Seguiu-se de incubação a 37°C por 16h. Como controle negativo foi utilizado água nas soluções de PCR. A amplificação foi realizada em termociclador da marca *Technne* em 30 ciclos de: 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 47°C, 45 segundos a 72°C, seguida de extensão final de 7 min a 72°C. Finalmente, 6 μ L das amostras de PCR foram aplicados e, realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Os géis foram corados pelo SYBR Gold (Invitrogen) em 50 mL de TBE 1X contendo 10 μ L de SYBR por 5 min.

Abaixo, esquema representativo da região escolhida para análise no promotor do gene *IL8*:

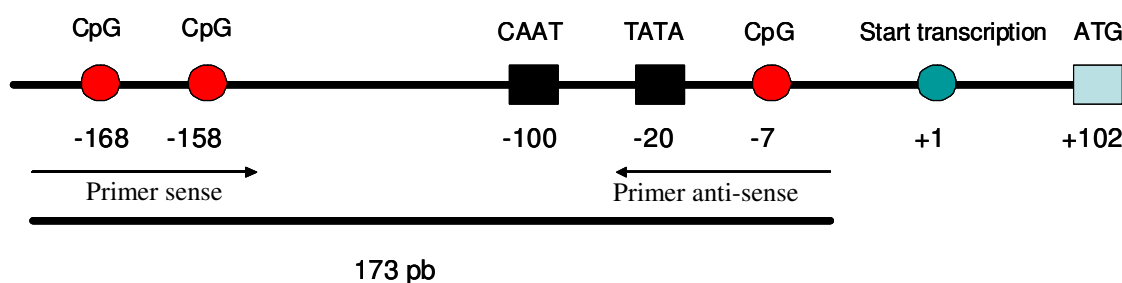


Figura 4 - Representação esquemática de parte da região promotora do gene *IL8*.

4.6 Análise de metilação no promotor dos genes *TLR2* e *TLR4*

A posição dos dinucleotídeos CpG escolhidos para o estudo dos genes *TLR2* e *TLR4* são importantes pois situam-se próximos à locais de ligação de fatores de transcrição. As regiões promotoras escolhidas foram submetidas à análise da presença de ilhas CpG no programa *CpGPlot*, e assim foi determinado que o promotor do *TLR2* apresenta ilha CpG ao contrário do promotor do gene *TLR4* (Figura 5A e B).

A análise de metilação para o promotor desses genes foi realizada a partir do método de Digestão Enzimática Sensível à Metilação (*Specific Methylation - Sensitive Restriction Enzymes*), cujo princípio está na digestão das amostras com sítios não metilados, e, portanto, como resultado a ausência de amplificação do fragmento, e não digestão dos sítios metilados, uma vez que a enzima utilizada para corte não reconhece o sítio metilado, e, conseqüentemente, amplificação desses.

DNA genômico foi submetido à digestão com enzimas de restrição sensíveis à metilação: *Aci* I, *Hha* I, *Hpa* II e *Hpy* CH4IV (New England Biolabs, Mississauga, ON, USA) em reações contendo 2U de cada da enzima, tampão 1x, 100ng de DNA genômico e água durante 16h a 37°C em reações individuais de 20 µL.

Para amplificação do DNA, a solução da PCR foi realizada em volume total de 25µL contendo: 12,5µL *Go Taq Green Master Mix* (1X) (Promega Corporations, Madison, Wi, USA), 2µL do set de primers (10µM), 5µL do volume de DNA digerido e água. Amplificação do fragmento de 127 pb do gene *TLR2* foi realizada em termociclador *Applied Biosystem* em 35 ciclos de: 1 min a 95°C, 1 min a 63°C, 1 min a 72°C, seguida de extensão final de 7 min a 72°C, com primer sense (5'-gaggtccagagttccctccg-3) e antisense (5'-ccgggactaggaagtaagca-3'). A sequência de primers foi obtida a partir da sequência publicada por Haehnel *et al.* (2002) e depositada no *GenBank* (*accession number* AC013303). Amplificação do fragmento de 393 pb do gene *TLR4* foi realizada em termociclador *Applied Biosystem* em 35 ciclos de: 1 min a 95°C, 1 min a 52°C, 1 min a 72°C, seguida de extensão final de 7 min a 72°C, com primer sense (5'-aaaggggaaatggggagtta-3) e anti-sense (5'-ttttgcaggacacaatttgg-3'). A sequência de primers foi obtida a partir da sequência depositada no *GenBank* (*accession number* AF172169). Finalmente, 5µL das amostras de PCR foram aplicados e a eletroforese realizada em gel de poliacrilamida a 10%. Os geis foram corados pelo SYBR Gold (Invitrogen) em 50 mL de TBE 1X contendo 10µL de SYBR Gold por 5 min.

Como controle das condições de digestão pelas enzimas, uma amostra de DNA não metilado foi gerada a partir da amplificação pela PCR para os genes *TLR2* e *TLR4*. Esses fragmentos foram digeridos nas mesmas condições que as amostras. Ainda, amostras de DNA não digerido foram incluídas como controle da reação de PCR, em paralelo às amostras digeridas e, ambas foram aplicadas no gel para eletroforese. Como controle negativo, soluções de PCR contendo água como amostra também foram utilizadas.

Ao todo, foram estudados treze sítios CpG do gene *TLR2* e dois sítios CpG do gene *TLR4*. A figura 5 apresenta esquema da região promotora dos genes *TLR2* e *TLR4* escolhida para análise neste estudo. A tabela 1 mostra as enzimas de restrição utilizadas e seus respectivos sítios de corte.

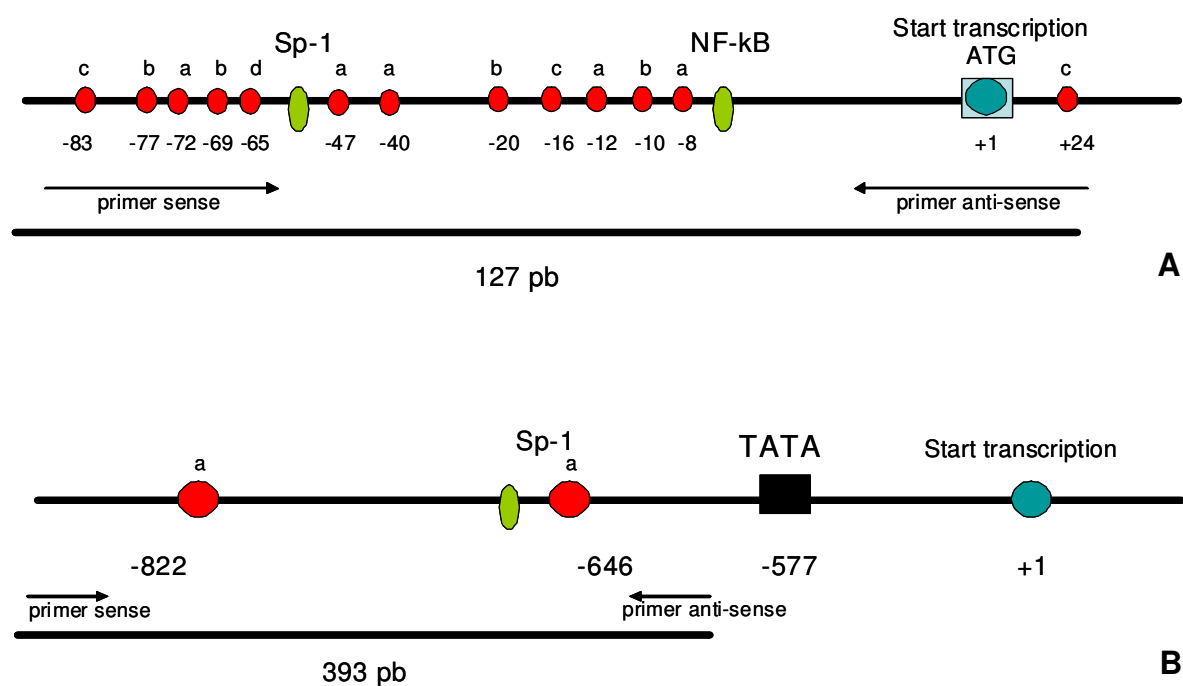


Figura 5 - (A) Representação esquemática de parte da região promotora do gene *TLR2*. **(B)** Representação esquemática de parte da região promotora do gene *TLR4*. Sítios CpG são mostrados em vermelho. Os sítios de ligação para diferentes fatores de transcrição são indicados. Sítios de digestão para enzimas sensíveis à metilação são indicados (a- sítio *Aci* I, b- sítio *Hha* I, c- sítio *Hpa* II, d- sítio *Hpy* CH4IV).

Tabela 1- Enzimas de restrição utilizadas para o estudo do gene *TLR2* (*Aci* I, *Hha* I, *Hpa* II e *Hpy* CH4IV) e *TLR4* (*Aci* I) e seus respectivos sítios de digestão.

Enzima de restrição sensível à metilação	Sítio de digestão
<i>Aci</i> I	5'... CCGC...3' 3'... GGCG...5'
<i>Hha</i> I	5'... GCGC...3' 3'... CGCG...5'
<i>Hpa</i> II	5'... CCGG...3' 3'... GGCC...5'
<i>Hpy</i> CH4 IV	5'... ACGT...3' 3'... TGCA...5'

4.7 Sequenciamento do gene *IL8*

Para verificar a especificidade das sequências metiladas e não metiladas, algumas amostras amplificadas para o gene *IL8* foram sequenciadas. Após a MSP, os fragmentos foram corridos em gel de agarose e purificados utilizando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean - Up System kit* (Promega Corporations), seguindo-se as recomendações do fabricante. Em seguida, 1µL de DNA, 1µL de primer sense (3µM), 8µL de tampão e 8µL de Reagente Big Dye Terminator Ready v. 2.0 em volume final de 20µL foram submetidos a PCR. Após, o DNA foi precipitado com isopropanol e etanol 70% e submetido ao sequenciamento em aparelho *ABI Prism 3130 Genetic Analyser* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.8 Análise de expressão de *IL8*

Transcrição reversa — 1 µg do RNA total foi submetido ao tratamento com *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen Carlsband, CA), segundo protocolo do fabricante. Para tanto, 1µg de RNA foi dissolvido em volume final de 8µL contendo 1µL de tampão e 1µL da 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 20µL.

PCR Quantitativo — A análise da expressão quantitativa do gene *IL8* foi realizada em reações de PCR em Tempo Real, pelo sistema SYBR Green. Os primers para amplificação do fragmento de 172 pb (sense 5'-gccaaagagaatatccgaactttaat-3'/anti-sense 5'-ctggctagcagactaggg-3') foram criados a partir de sequências de mRNA para o gene alvo depositadas no *GenBank*. Os primers foram confeccionados utilizando o *software LightCycler Probe Design* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). A reação quantitativa da 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 IL-8 foram utilizados: 4µL do reagente do kit, 9µL de água livre de nucleases, 1µL da solução contendo cada primer (10µM) e 5µL de cDNA. Durante a padronização, os produtos de amplificação também foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em comparação a padrões de massa 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. Neste estudo, o gene de referência escolhido foi *GAPDH*. Para as reações de PCR em tempo real para *GAPDH* foram utilizados: 4µL do reagente do kit, 9,8µL de água livre de nucleases, 0,6µL da solução contendo cada primer (10µM) e 5µL de cDNA.

4.9 Análise Estatística

Análise de metilação — 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 partir do Software BioEstat 5.0.

Análise de expressão — O nível de transcritos entre os grupos foi avaliado utilizando o teste não paramétrico de Kruskal - Wallis ao nível de significância de 5%, a partir do Software BioEstat 5.0.

Análise de metilação versus expressão — A correlação entre padrão de metilação encontrado no DNA e expressão gênica foi analisada pelo teste de coeficiente não linear de Spearman ao nível de significância de 5%, a partir do Software BioEstat 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 *IL8*

Os resultados do promotor do gene *IL8* estão publicados em *Journal of Clinical Periodontology* 2009 (36) 719-25 com o título “DNA methylation status of the *IL8* gene promoter in oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis” (anexo 4).

A tabela abaixo apresenta os dados clínicos e demográficos da amostra selecionada para o estudo do gene *IL8*.

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros clínicos e demográficos da população estudada para análise do gene *IL8*. ($p>0,05$; ANOVA).

	Saudável <i>n</i> = 41	Fumante <i>n</i> = 30	Não Fumante <i>n</i> =40
Idade (anos)	46,2 ± 14,1	47,03 ± 6,49	44,94 ± 9,17
% Homens	33,4	55,8	40,5
% Mulheres	66,6	44,2	59,5
Profundidade de sondagem (mm)	---	7,8 ± 2,02	7,9 ± 2,18
Cigarros/ dia	---	15,6 ± 7,32	---
Consumo cigarros (em anos)	---	22,3 ± 9,26	---

O sequenciamento automático confirmou a especificidade das sequências metiladas e não metiladas amplificadas por MSP (Fig. 6).

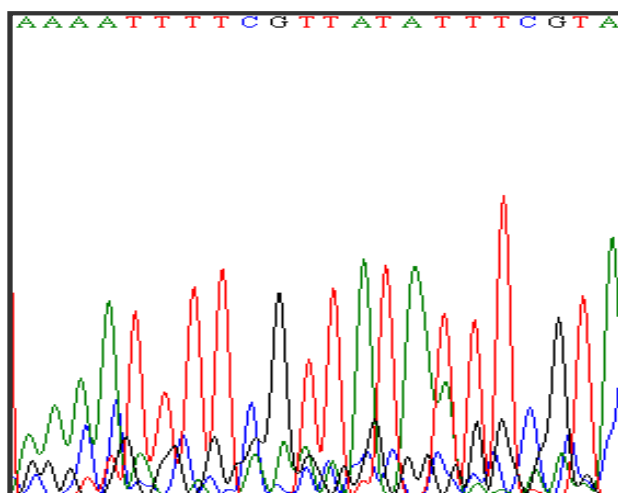


Figura 6 - Sítios CpG metilados no promotor do gene *IL8* confirmados após sequenciamento.

Os resultados obtidos a partir das células epiteliais da mucosa bucal mostraram que a maioria dos indivíduos do grupo saudável é positiva para ambas as condições, metilada e não metilada. Entretanto, uma alta porcentagem de indivíduos dos grupos periodontite fumante e não fumante apresentaram positividade somente para a condição não metilada. Praticamente todos os indivíduos do grupo saudável foram positivos para a condição metilada, enquanto que somente 23% e 20% dos indivíduos dos grupos periodontite fumante e não fumante respectivamente apresentaram metilação. Isso ocorreu independente da idade e a diferença entre o grupo saudável e os grupos periodontite foi significativa (Fig. 7) ($p < 0,0001$; χ^2).

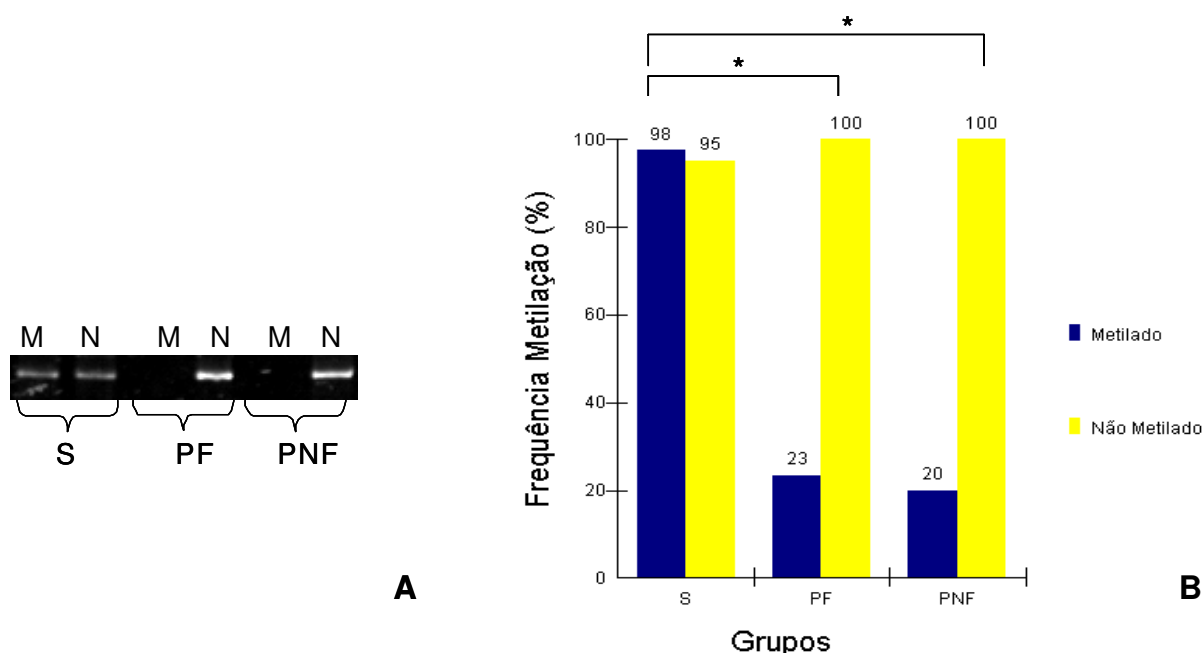


Figura 7 - (A) Bandas de *IL8* com 173 pb, derivada de células epiteliais da mucosa bucal. S= Saudável (n=41); PF= Periodontite Fumante (n=30); PNF= Periodontite Não Fumante (n=40); M=Metilado; N=Não metilado. **(B)** Frequência de metilação no promotor do gene *IL8* para células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos saudáveis e com periodontite crônica fumantes e não fumantes. (* $p < 0,0001$; χ^2).

O mesmo não foi observado para o DNA purificado de tecido gengival (Fig. 8) e leucócitos do sangue periférico (Fig. 9). As células do sangue foram utilizadas como controle endógeno. Não foram observadas diferenças entre as condições

metilada e não metilada para esses tecidos. A maioria dos indivíduos foi positiva para ambas as condições nos três diferentes grupos.

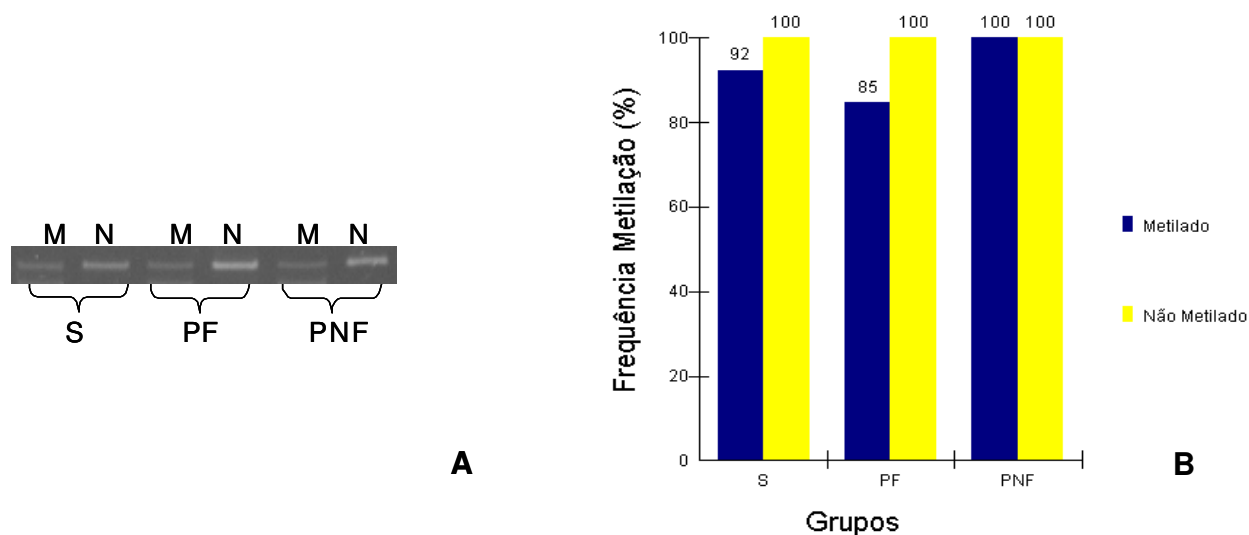


Figura 8 - (A) Bandas de *IL8* com 173 pb, derivada de tecido gengival. S= Saudável (n=13); PF= Periodontite Fumante (n=13); PNF= Periodontite Não Fumante (n=13); M=Metilado; N=Não metilado. **(B)** Frequência de metilação no promotor do gene *IL8* para tecido gengival de indivíduos saudáveis e com periodontite crônica fumantes e não fumantes. ($p>0,05$; χ^2).

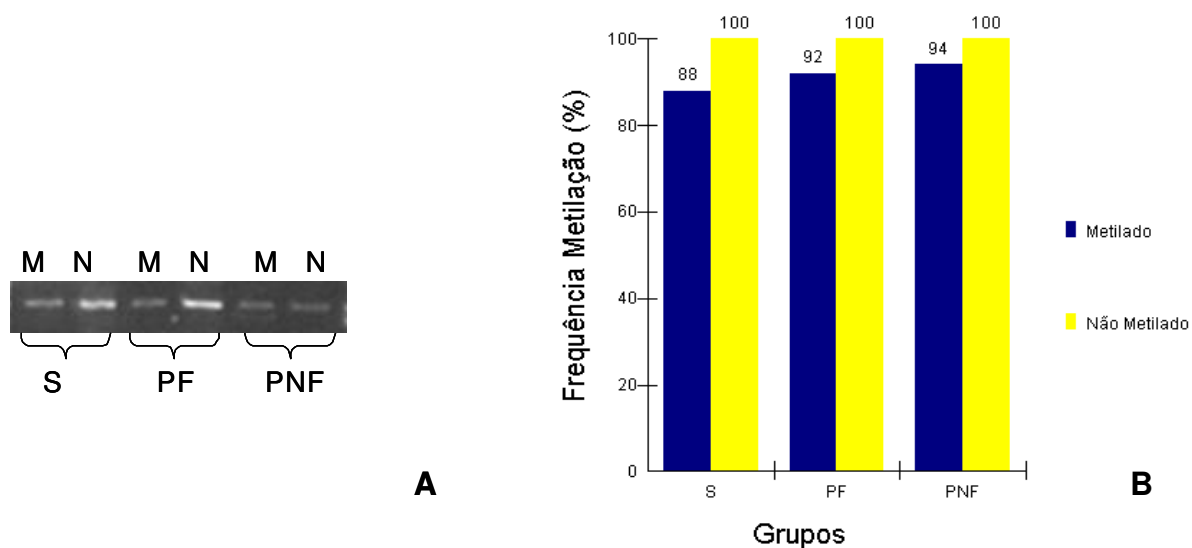


Figura 9 - (A) Bandas de *IL8* com 173 pb, derivada de células sanguíneas. S= Saudável (n=13); PF= Periodontite Fumante (n=13); PNF= Periodontite Não Fumante (n=13); M= Metilado; N= Não metilado. **(B)** Frequência de metilação no promotor do gene *IL8* para células sanguíneas de indivíduos saudáveis e com periodontite crônica fumantes e não fumantes. ($p>0,05$; χ^2).

Uma vez que houve diferença no padrão de metilação entre os grupos para as células epiteliais da mucosa bucal, foi investigado o padrão de expressão deste gene. Os resultados mostraram que os níveis de transcritos de *IL8* foram maiores nos grupos afetados pela periodontite, principalmente para o grupo fumante (Fig. 10) ($p=0,007$; Kruskal–Wallis). Entretanto, não foi observada correlação direta nas amostras entre o padrão de metilação encontrado e a expressão gênica da IL-8 ($p>0,05$; Coeficiente de Spearman).

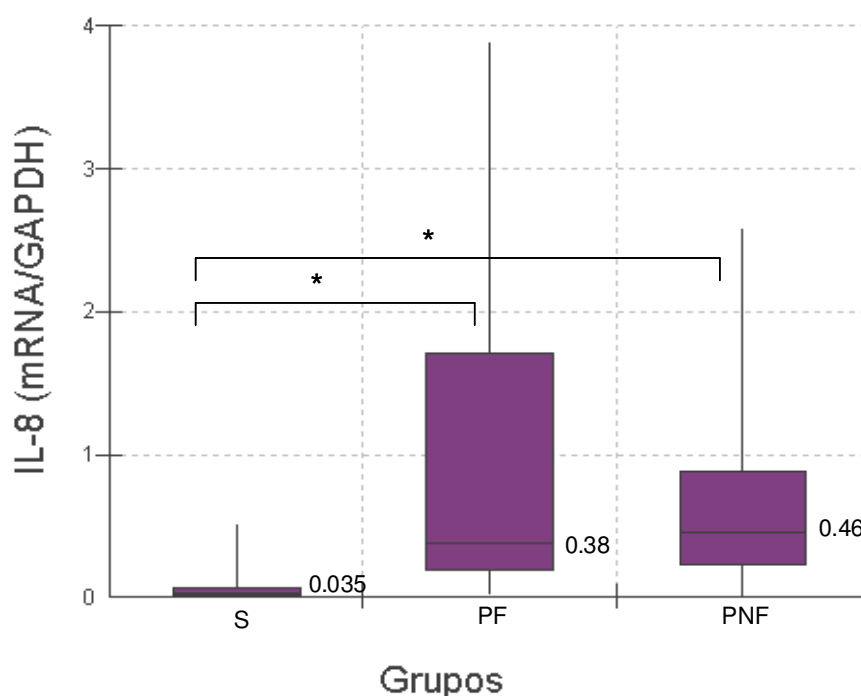
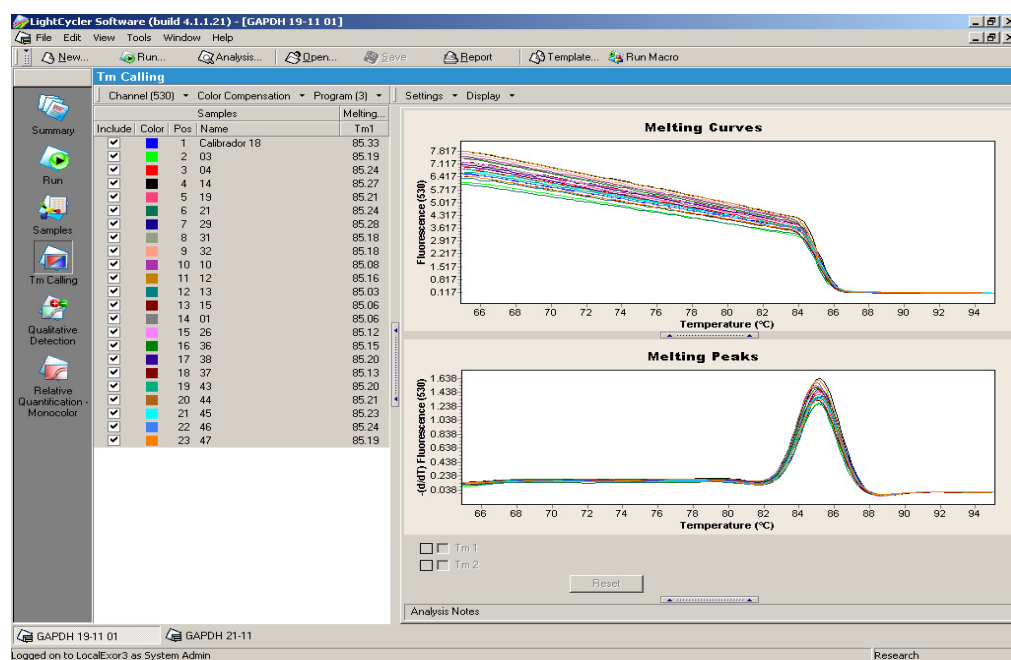
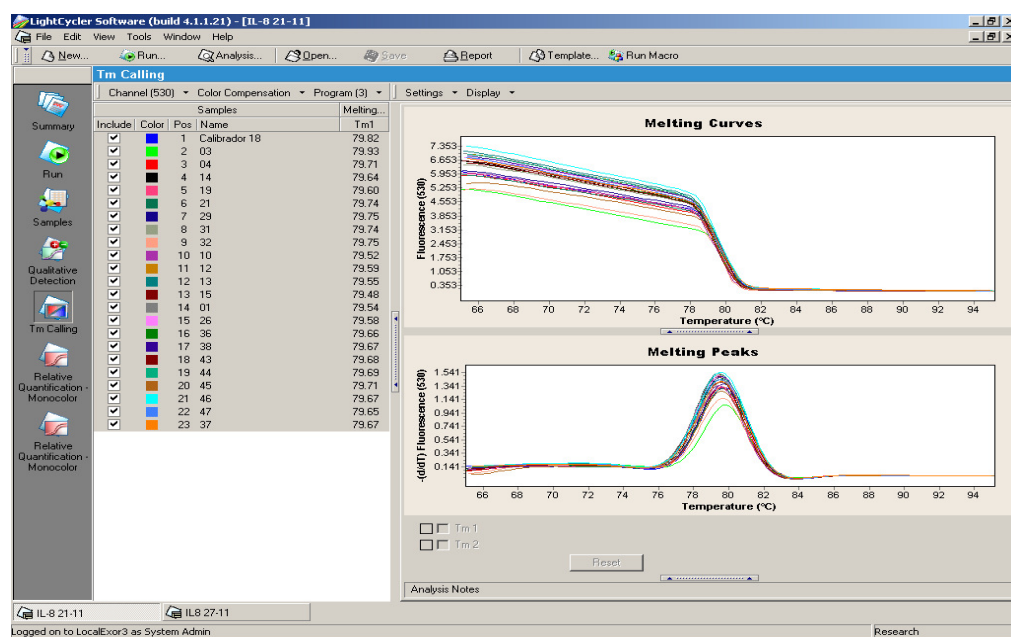


Figura 10 – Níveis de transcritos de *IL8* em tecido gengival de indivíduos saudáveis e com periodontite crônica fumantes e não fumantes. S=Saudável ($n=13$); PF=Periodontite Fumante ($n=13$); PNF=Periodontite Não Fumante ($n=13$). Resultados apresentados como mediana e valores mínimo e máximo. (* $p=0,007$; Kruskal–Wallis).

A figura 11 mostra a imagem da PCR Real Time (*Melting Curve*) mostrando a especificidade da reação para o gene *GAPDH* e para o gene *IL8*.



A



B

Figura 11 - (A) PCR em tempo real para *GAPDH*. (B) Real-time PCR para *IL8*.

5.2 TLR2 e TLR4

Os dados clínicos e demográficos da amostra selecionada para o estudo dos genes *TLR2* e *TLR4* são mostrados na tabela que segue.

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros clínicos e demográficos da população estudada para análise dos genes *TLR2* e *TLR4*. ($p > 0,05$; ANOVA).

	Saudável <i>n</i> = 40	Fumante <i>n</i> = 40	Não Fumante <i>n</i> = 40
Idade (anos)	39,8 ± 15,5	45,7 ± 7,4	45,5 ± 10,1
% Homens	32,5	52,5	32,5
% Mulheres	67,5	47,5	67,5
Profundidade de sondagem (mm)	---	7,8 ± 1,9	7,4 ± 2,1
Cigarros/ dia	---	16,5 ± 7,6	---
Consumo cigarros (em anos)	---	23,7 ± 9,1	---

O método escolhido para análise de metilação nos genes *Toll-like*, *Digestão Enzimática Sensível à Metilação*, permite o estudo de vários sítios CpG com a utilização de apenas um par de primers, porém, esta metodologia fica restrita a regiões CpG que possuam enzimas de restrição sensíveis à metilação que reconheçam a sequência de nucleotídeos do sítio que se deseja estudar. O princípio da técnica se baseia na digestão do DNA genômico pelas enzimas de restrição sensíveis à metilação que não reconhecem a sequência de clivagem quando a citosina se apresenta metilada. Assim, a ausência de bandas após a amplificação indica ausência de metilação em CpG contido no sítio de restrição, enquanto a presença de bandas após a amplificação indica a presença de metilação em CpG contido no sítio de restrição. Desta forma, quando esta técnica é utilizada, é importante sempre usar amostra de DNA genômico que não sofreu digestão pelas enzimas como controle da amplificação pela PCR para cada amostra analisada.

Para o promotor do gene *TLR2*, a maioria dos indivíduos em todos os grupos (em alguns sítios a totalidade dos indivíduos) foi positiva para metilação tanto nas células epiteliais da mucosa bucal (Fig. 12 e 13) quanto nas células do

tecido gengival (Fig. 14 e 15). Como não foram observadas diferenças na frequência de metilação para esses tecidos, a análise de metilação em leucócitos do sangue periférico, utilizada como controle endógeno, e análise de expressão gênica não foi realizada.

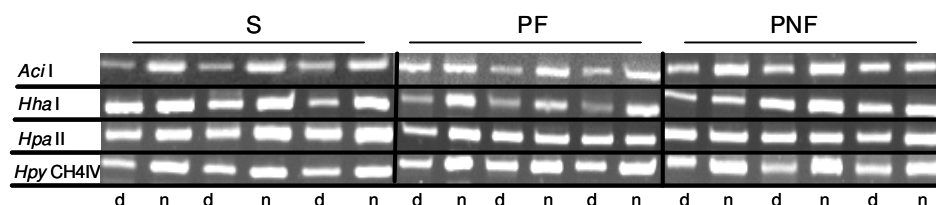


Figura 12 - Bandas de 127 pb do gene *TLR2* de DNA digerido (d) e não digerido (n) de células epiteliais da mucosa bucal. S=Saudável (n=40), PF=Periodontite Fumante (n=40), PNF=Periodontite Não Fumante (n=40).

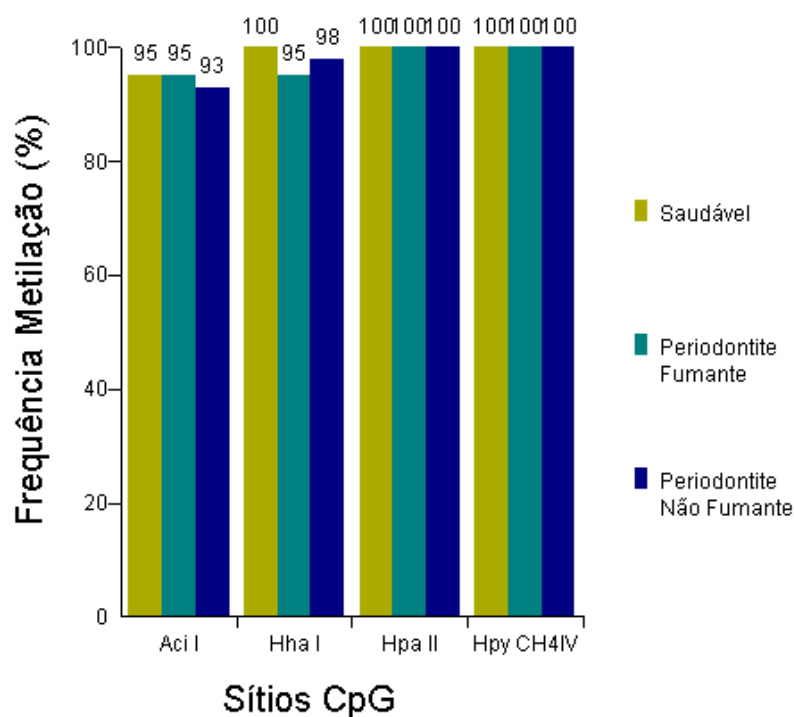


Figura 13 - Frequência de metilação no promotor do gene *TLR2* em células epiteliais da mucosa bucal. Sítio *Aci I* ($p=0,85$; χ^2); sítio *Hha I* ($p=0,35$; χ^2); sítio *Hpa II* ($p=1,0$; χ^2); sítio *Hpy CH4IV* ($p=1,0$; χ^2) Saudável n=40; Periodontite Fumante n=40; Periodontite Não Fumante n=40.

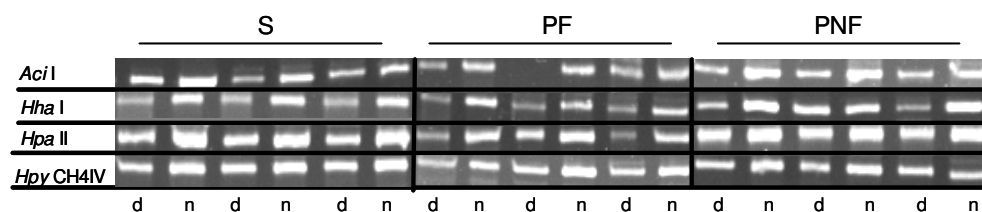


Figura 14 - Bandas de 127 pb do gene *TLR2* de DNA digerido (d) e não digerido (n) de tecido gengival. Saudável n=14; Periodontite Fumante n=12; Periodontite Não Fumante n=18.

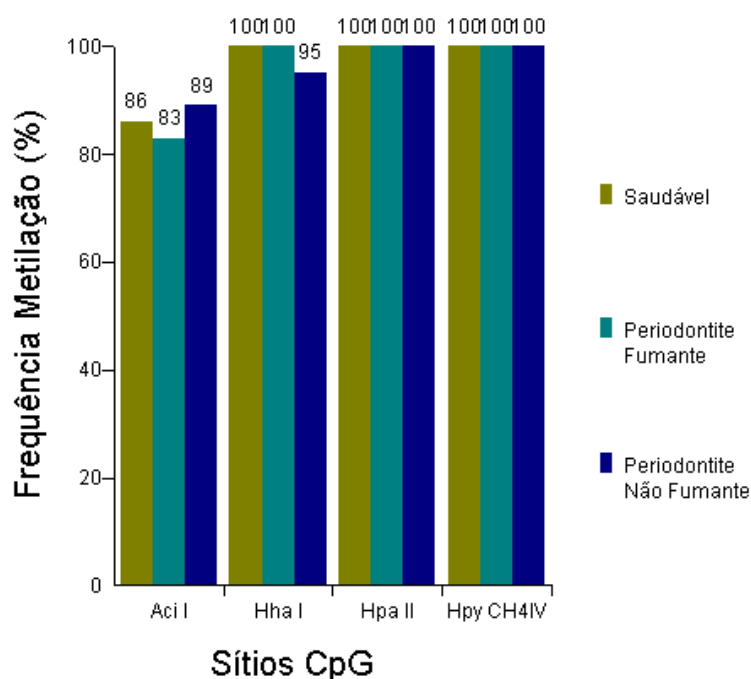


Figura 15 - Frequência de metilação no promotor do gene *TLR2* em tecido gengival. Sítio *Aci I* ($p=0,90$; χ^2); sítio *Hha I* ($p=0,47$; χ^2); sítio *Hpa II* ($p=1,0$; χ^2); sítio *Hpy CH4IV* ($p=1,0$; χ^2). Saudável n=14; Periodontite Fumante n=12; Periodontite Não Fumante n=18.

Entretanto, quando comparada a intensidade das bandas obtidas após amplificação do DNA que não sofreu digestão, com a intensidade das bandas obtidas após amplificação do DNA que sofreu digestão, percebe-se que a metilação em certos dinucleotídeos CpG no promotor do gene *TLR2* não deve ocorrer em todas as células, e/ou em todos os alelos.

Nota-se que a intensidade das bandas obtidas após a digestão do DNA é visivelmente menor, indicando que provavelmente parte do DNA apresenta-se não

metilado e, portanto, pode sofrer digestão enzimática (Fig. 12 e 14). Com base nessa observação, a intensidade das bandas foi mensurada em todas as amostras a partir do Software *Image J*. A quantificação relativa considerou que a amostra de DNA que não sofreu digestão pelas enzimas representava o DNA totalmente amplificado (100% das cópias do *template* inicial são amplificadas). Desta forma, o valor da quantificação da banda obtida do DNA que sofreu a digestão era subtraído do valor da quantificação da banda de DNA que não sofreu a digestão e a diferença do resultado transformado em valor relativo estimado da porção de DNA que provavelmente estava desmetilada e, assim, não foi amplificada. Esta análise foi realizada individualmente para cada enzima de restrição utilizada que clivava diferentes sítios CpG no gene *TLR2*.

Os resultados mostram que os sítios *Aci* I e *Hha* I, apresentaram maior proporção de desmetilação entre os quatro sítios estudados para *TLR2*. Para células epiteliais da mucosa bucal, a proporção de DNA não metilado para o sítio *Aci* I foi de 49,5%, 54,6% e 36,6 % para os grupos saudável, periodontite fumante e periodontite não fumante respectivamente. No sítio *Hha* I os valores médios de desmetilação foram: 42%, 58% e 40% para os grupos saudável, periodontite fumante e periodontite não fumante respectivamente. O sítio *Hpa* II apresentou a menor proporção de DNA não metilado, com 22% de desmetilação para os grupos saudável e periodontite fumante e 29% para o grupo periodontite não fumante. O sítio *Hpy* CH4IV apresentou proporções de DNA não metilado de 42,6%, 39,5% e 39,5% para os grupos saudável, periodontite fumante e periodontite não fumante respectivamente (Fig. 16). Para o tecido gengival esses valores foram ainda maiores, principalmente para os sítios *Aci* I, *Hha* I e *Hpa* II. O sítio *Aci* I apresentou proporções de desmetilação de 40%, 54% e 47% para os grupos saudável, periodontite fumante e periodontite não fumante. Esses mesmos grupos apresentaram desmetilação de 71,5%, 55,6% e 54,5% respectivamente para o sítio *Hha* I. Valores médios de desmetilação para o sítio *Hpa* II foram 30,7%, 47,5% e 26,8% para os grupos saudável, periodontite fumante e periodontite não

fumante respectivamente. E finalmente o sítio *Hpy* CH4IV apresentou 27%, 22,1% e 48,5% de desmetilação para os mesmos grupos. (Fig. 17).

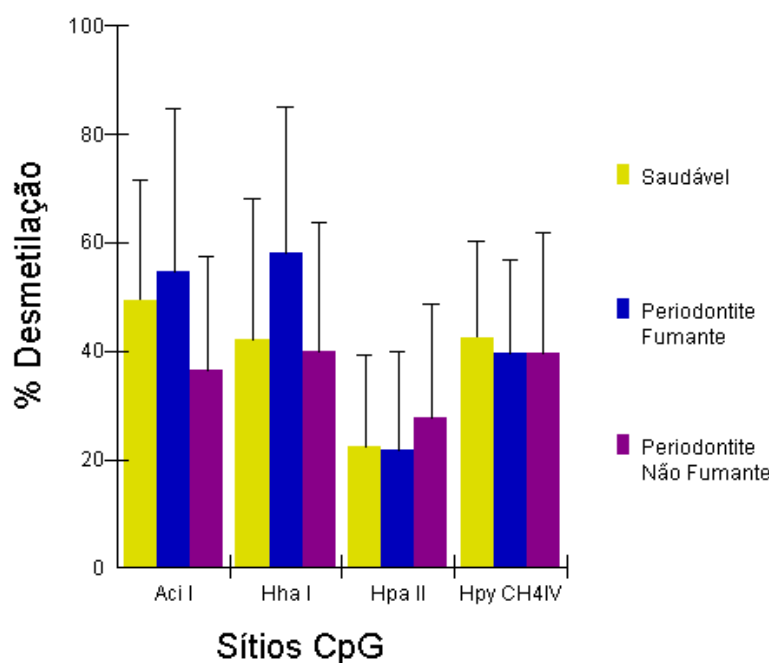


Figura 16 – Proporção de desmetilação, obtida a partir de medidas de intensidade de bandas de DNA digerido e DNA não digerido no promotor do gene *TLR2* de células epiteliais da mucosa bucal. Saudável n=40; Periodontite Fumante n=40; Periodontite Não Fumante n=40. Resultados apresentados como média e desvio padrão. (One-Way ANOVA seguido de Teste de Dunnet com nível de significância de 1%). $p>0,01$.

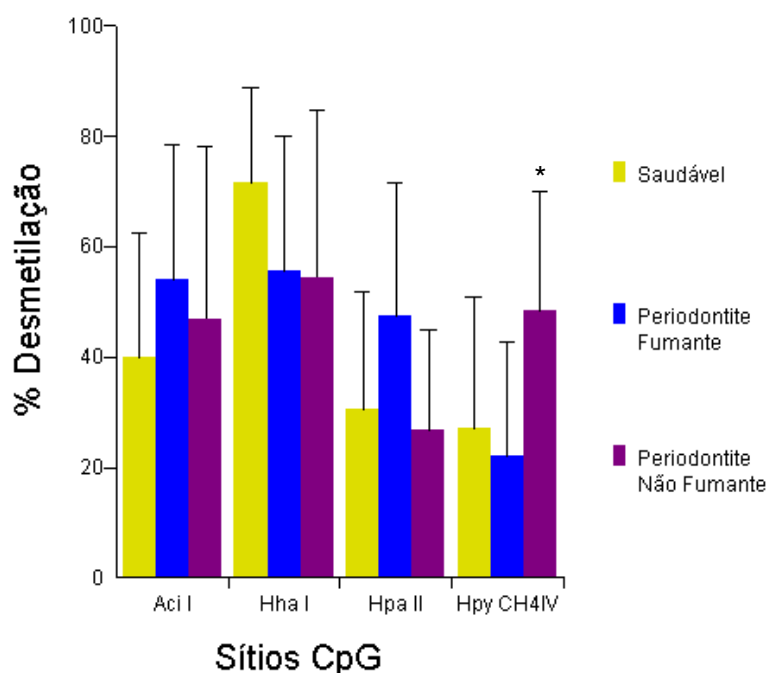


Figura 17 – Proporção de desmetilação, obtida a partir de medidas de intensidade de bandas de DNA digerido e DNA não digerido no promotor do gene *TLR2* de tecido gengival. Saudável n=14; Periodontite Fumante n=12; Periodontite Não Fumante n=18. Resultados apresentados como média e desvio padrão. (One-Way ANOVA seguido de Teste de Dunnet com nível de significância de 1%). * $p<0,01$.

Em contraste, a análise de metilação para o promotor do gene *TLR4* mostrou que a maioria dos indivíduos de todos os grupos está desmetilada nos sítios CpG estudados (Fig. 18 e 19). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. A desmetilação do gene *TLR4* foi ainda maior no tecido gengival em comparação com as células epiteliais da mucosa bucal, sendo esta diferença significativa dentro dos grupos afetados pela periodontite crônica (Fig. 19) ($p=0,03$; χ^2). Como não foram observadas diferenças no padrão de metilação entre os grupos, as análises de metilação para células sanguíneas (controle endógeno) e expressão gênica não foram realizadas.

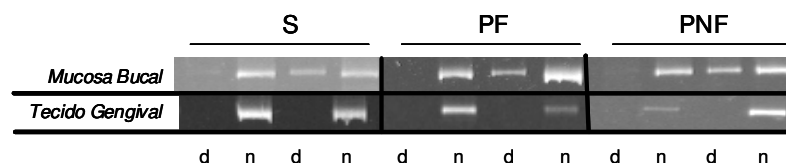


Figura 18 - Bandas de 393 pb do gene *TLR4* de DNA digerido (d) e não digerido (n), sítio *Aci* I. Células epiteliais da mucosa bucal: S=Saudável (n=40), PF=Periodontite Fumante (n=40), PNF=Periodontite Não Fumante (n=40). Tecido gengival: S=Saudável (n=14), PF=Periodontite Fumante (n=12), PNF=Periodontite Não Fumante (n=18).

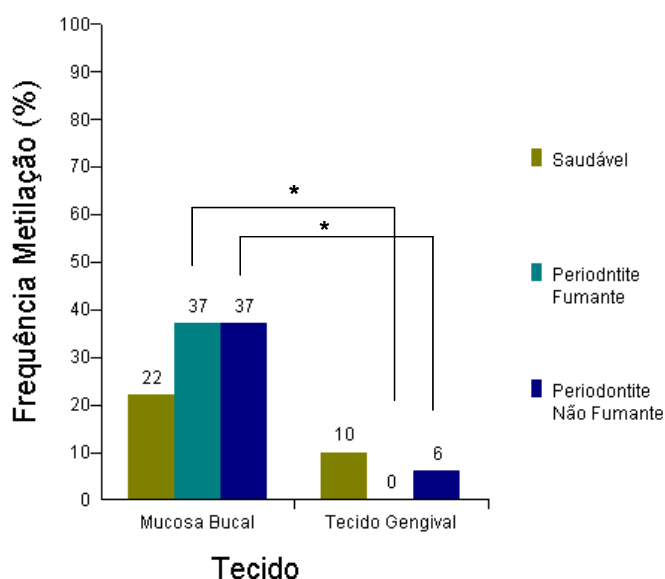


Figura 19 - Frequência de metilação no promotor do gene *TLR4*, sítio *Aci* I. Células epiteliais da mucosa bucal ($p=0,25$; χ^2) (Saudável n=40; Periodontite Fumante n=40; Periodontite Não Fumante n=40). Tecido gengival ($p=0,55$; χ^2). Saudável n=14; Periodontite Fumante n=12; Periodontite Não Fumante n=18. (* $p=0,03$; χ^2).

6. DISCUSSÃO

O entendimento da epigenética tornou mais claro o mecanismo pelo qual hábitos como fumar e beber, dieta, meio ambiente e infecções afetam o DNA de células tecido-específicas e alteraram o comportamento das células deste tecido. Estudos de padrão de metilação de DNA têm emergido como um importante campo de pesquisa em muitas doenças, se não todas, incluindo a periodontite crônica, uma vez que a alteração do padrão de metilação pode modificar dramaticamente a transcrição gênica.

Estudos mostram que a repressão transcricional causada pela metilação na molécula de DNA parece ser mediada por uma família de proteínas ligantes de radical metil, as *Metil Binding Proteins* (MBP) tais como MeCP1 e MeCP2 (Wade, 2001) que interagem indiretamente com o DNA pela associação aos radicais metil, impossibilitando fisicamente a ligação de fatores de transcrição ou da própria maquinaria transcricional ao DNA. Enquanto MeCP1 requer múltiplos sítios CpG metilados para se ligar ao DNA e promover a condensação da cromatina, a proteína MeCP2 é capaz de se ligar a somente um sítio CpG metilado. Já se sabe que a interação entre MeCP2, um único sítio CpG metilado e, elementos *enhancer* distantes deste sítio pode ocorrer devido a dobras da cromatina que aproximam estes elementos. Assim, elementos *enhancer* distantes de um gene podem interagir com estas proteínas ligantes de grupo metil e modificar a transcrição gênica dramaticamente (Bird, 1986).

Interleucina-8

O promotor do gene *IL8* não é uma típica ilha CpG e não contém sequências repetidas de dinucleotídeos CpG, ao contrário, os sítios CpG são esparsos e distantes entre si. Análise de metilação, em sítios que aparecem esparsos pelos genes é normalmente negligenciada, porém, isto não significa que a alteração nesses sítios, não possa afetar a função do gene. Os dinucleotídeos CpG selecionados para análise no promotor do gene *IL8* estão localizados próximos à região compreendida entre os nucleotídeos -136 e +43. Essa região

representa uma área de modulação basal de transcrição, consistindo de quatro elementos regulatórios *cis*, com sítio de ligação para NF- κ B (-82 e -70), sítio CCAAT (-94 e -84) e sítio de ligação para proteína AP-1 (-126 e -120). Os quatro elementos regulatórios *cis* estão localizados entre os nucleotídeos -90 e -93, sendo ativados pelo fator Oct-1, que regula a transcrição de IL-8 (de Larco *et al.*, 2003). Esses sítios se posicionam também próximos às caixas TATA e CCAAT, importantes regiões do promotor para a iniciação da transcrição do gene.

Neste estudo nós observamos que a maioria dos indivíduos do grupo saudável mostrou positividade para ambas as condições, metilada e desmetilada, para o promotor do gene *IL8*, tanto para células epiteliais da mucosa bucal quanto para células do tecido gengival e células sanguíneas. Isto pode sugerir que a metilação talvez seja um mecanismo de controle da expressão alélica. Os grupos periodontite fumante e não fumante apresentaram grande porcentagem de indivíduos positivos somente para a condição não metilada. O mesmo não foi observado para células do tecido gengival e células do sangue para esses grupos. A diferença observada para o gene da IL-8 nas células epiteliais da mucosa bucal entre o grupo saudável e os grupos periodontite pode ser resultado do efeito direto da infecção/inflamação sobre as células que estão mais expostas na cavidade bucal ou também uma resposta diferencial destas células aos produtos bacterianos da infecção/inflamação, já que a IL-8 atua como uma citocina chave no processo de defesa.

Os níveis de transcritos de *IL8* foram maiores para os grupos periodontite em comparação ao grupo saudável, principalmente no grupo fumante. Estudos anteriores já haviam revelado níveis elevados de IL-8 em indivíduos fumantes com periodontite crônica (Giannopoulou *et al.*, 2003). Foi sugerido que a fumaça do cigarro induz mais células a produzir IL-8, resultando numa acumulação local de neutrófilos. Sob condições normais, a expressão de IL-8 contribui para a eliminação de bactérias pelos neutrófilos. A liberação excessiva de IL-8 leva a uma hiperatividade dos neutrófilos, contribuindo para a destruição tecidual, marcada pela liberação de MMPs por essas células (Yoshimura *et al.*, 1997). Isso poderia

contribuir para a severidade da periodontite em fumantes, que geralmente é maior em relação aos indivíduos não fumantes. Entretanto, no presente trabalho, não foi observada relação direta entre o padrão de metilação e a expressão gênica de *IL8*. O tecido gengival do qual foi extraído o RNA, apresentou positividade para as condições metilada e não metilada e esse resultado não foi diferente entre os grupos, embora os níveis de transcritos foram maiores para os grupos periodontite. Mas uma relação indireta pode ser observada. O padrão de metilação dos grupos periodontite para a mucosa bucal foi desmetilado em sua maioria, e isso pode ter uma relação com a maior expressão do gene. Esse tecido apresenta um padrão homogêneo de células, e, portanto, reflete também um padrão de metilação mais homogêneo, ao contrário do tecido gengival que apresenta vários tipos celulares, inclusive células epiteliais, e cada qual com seu padrão específico. Talvez por isso, encontramos grande presença da condição metilada, mesmo nos grupos periodontite para o tecido gengival.

Assim, um mecanismo liberador da transcrição do gene como a desmetilação poderia ser “benéfico” ao tecido afetado porque estimularia o processo de defesa pelos neutrófilos, mas ao mesmo tempo “maléfico”, pois potencializaria a degradação tecidual.

O modo como as células epiteliais da mucosa bucal foram obtidas não permite a coleta especificamente de queratinócitos bucais. Além de células epiteliais, a saliva pode conter também outras células, tais como neutrófilos e monócitos, especialmente em pacientes com periodontite crônica devido aos sangramentos. Entretanto, acreditamos que essa possível contaminação não tenha interferido nos resultados das reações de PCR, pois observamos massiva desmetilação nas amostras provenientes de células epiteliais da mucosa bucal.

Nas amostras de células coletadas da saliva as principais células obtidas são as células epiteliais. Já o tecido gengival é formado por um grupo de células muito mais heterogêneo como os próprios queratinócitos, fibroblastos gengivais, células do sangue como neutrófilos e linfócitos, células endoteliais, macrófagos e ainda outros tipos celulares possivelmente presentes em menor quantidade. Desta

forma, os resultados do padrão de metilação nas células epiteliais da mucosa bucal foram obtidos de um grupo mais homogêneo de células equanto os resultados do padrão de metilação observados nas células do tecido gengival não refletem uma única população celular. Diferenças entre as células presentes na gengival podem existir, porém não puderam ser detectadas devido às limitações técnicas deste projeto.

É importante também mencionar que células basais que originam o epitélio bucal permanecem na cavidade oral durante toda a vida do indivíduo, enquanto que fibroblastos do tecido conjuntivo, células inflamatórias e sanguíneas presentes nos tecidos periodontais são continuamente renovadas. Assim, a exposição de células epiteliais por longos períodos a produtos bacterianos e citocinas inflamatórias pode ser uma possível causa da perda de metilação observada nesse tecido.

Receptores Toll-like 2 e 4

Além dos genes de citocinas da inflamação, outros genes de proteínas envolvidas na doença periodontal devem ser investigados, pois também podem sofrer modificações epigenéticas, modificações no padrão transcricional e, assim, alterar a resposta aos fatores de virulência. Como previamente descrito, os receptores Toll-like são importantes na patogênese da doença periodontal, pois reconhecem padrões moleculares associados à patógenos. Os receptores Toll-like 1-9 são expressos por células do tecido gengival normal e esta expressão aumenta nas células do tecido inflamado. Diferenças estatísticas significantes foram observadas na expressão de TLR-2 e TLR-4 entre indivíduos com periodonto saudável e com periodontite, sendo estes receptores, aliás, os membros mais importantes envolvidos na periodontite crônica (Beklen *et al.*, 2008).

Diferente do gene *IL8*, que foi analisado pelo método de transformação pelo bissulfito de sódio, os genes *TLR2* e *TLR4* foram analisados utilizando enzimas de restrição sensíveis à metilação. Este método foi eleito devido a possibilidade do

uso de enzimas para análise dos dinucleotídeos CpG escolhidos e representa um método fácil e de baixo custo. A técnica de MSP foi descartada para estes genes porque as regiões escolhidas para o estudo nos promotores do *TLR2* e *TLR4* foram submetidas à análise do programa *MethPrimer* (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>), que desenha primers para PCR específica para metilação (MSP), ou seja, para fragmentos transformados pelo bissulfito de sódio e, de acordo com o programa, não foi possível a confecção de primers ótimos para a região escolhida do promotor do *TLR4* e *TLR2* utilizando o método de MSP.

Outro fator levado em consideração para a não escolha da metodologia de MSP para esse promotor foram estudos mostrando que algumas sequências altamente metiladas são resistentes à conversão pelo bissulfito de sódio (Harrison *et al.*, 1998). Esses autores utilizaram um modelo bem definido de metilação, e observaram que, citosinas localizadas imediatamente próximas a CpGs metilados falham em sofrer conversão em aproximadamente 30% das moléculas. A falha na conversão é dependente de ambas as sequências e o estado de metilação de CpGs adjacentes. Esse tipo de não conversão parece ser limitado a sequências específicas, frequentemente em regiões CpG, e parece envolver a formação de estruturas secundárias estáveis próximas ao sítio CpG, criando uma região localizada de DNA dupla fita e prevenindo o acesso pelo bissulfito. Interessantemente, a falta de completa conversão parece ser mais pronunciada em regiões ricas em dinucleotídeos CpG que são hipermetiladas em comparação à mesma sequência que é hipometilada. Isso pode ser devido ao efeito das citosinas metiladas na temperatura de melting do fragmento, deixando assim o fragmento mais resistente à desnaturação e, conseqüentemente, à conversão pelo bissulfito.

Os dinucleotídeos CpG selecionados no promotor dos genes *TLR2* e *TLR4* estão localizados próximos a sítios de transcrição importantes. Essas regiões respondem aos fatores de transcrição NF- κ B e Sp-1. A região 5' proximal do

promotor do *TLR2* não apresenta TATA box ou regiões consenso. Entretanto, apresenta regiões ricas em CpG, sendo assim um promotor com ilha CpG típica, como verificado no *CpGPlot*, com critério descrito por Takai & Jones (2002). Dos muitos sítios de metilação encontrados nessa região, treze foram analisados no presente estudo.

Os resultados para o *TLR2* mostraram presença de bandas após digestão enzimática, o que indica que tanto as células epiteliais da mucosa bucal quanto as células do tecido gengival estão metiladas nos sítios CpG investigados. Entretanto, foi possível perceber que parte do DNA não era amplificada, e isto deveria corresponder a uma porcentagem de DNA que estava provavelmente desmetilado nestes sítios. Os sítios CpG clivados pelas enzimas de restrição *Aci* I e *Hha* I foram os mais frequentemente observados desmetilados. Isto mostra que certos dinucleotídeos CpG no promotor do gene do *TLR2* não estão metilados em 100% das células das camadas mais externas do tecido epitelial bucal e 100% das células do tecido gengival. As enzimas *Aci* I, *Hha* I e *Hpa* II possuem mais de uma região de corte na região analisada do promotor do gene *TLR2* e estas regiões poderiam estar totalmente desmetiladas ou parcialmente desmetiladas. O padrão de metilação nestas ilhas pode ainda ser diferente entre os alelos.

Estudos prévios de metilação no promotor do *TLR2* detectaram metilação moderada (aproximadamente 50%) na linhagem de queratinócitos HaCat (Haehnel *et al.*, 2002). Nesse mesmo estudo, outras células normais apresentaram completa desmetilação. Um pouco mais tarde, foi demonstrado que algumas linhagens celulares apresentaram completa desmetilação ou porcentagens baixas de metilação, chegando ao máximo de 20 a 30% (Shuto *et al.*, 2006). Analisados conjuntamente esses dados nos mostram que nem todas as ilhas CpG são totalmente desmetiladas em todas as células.

A maior proporção de desmetilação encontrada em CpG alvo da *Aci* I e *Hha* I pode talvez indicar uma participação desses sítios na transcrição gênica. Dois sítios CpG clivados pela *Aci* I estão muito próximos ao sítio de ligação do fator de

transcrição Sp-1 e um sítio *Aci* I e outro *Hha* I estão muito próximos ao sítio de ligação do fator NF- κ B. Sabe-se que este fator de transcrição possui papel central na regulação da resposta imuneinflamatória e tem papel chave na patofisiologia de doenças importantes que ocorrem em muitos órgãos, participando também na homeostase dos tecidos (Li & Verma, 2002). Além do NF- κ B, o fator de transcrição Sp-1 também já foi mostrado como fator principal na transcrição constitutiva e induzida de TLR-2 em células de murinos (Wang *et al.*, 2001) e humanas (Johnson & Tapping, 2007). Recentemente, foi mostrado que uma região específica do promotor do *TLR2*, a qual contém dois sítios *Aci* I muito próximos, é importante para a ligação de Sp-1 em células epiteliais humanas. Ainda nesse mesmo estudo foi encontrado desmetilação nesses sítios e houve relação direta com a expressão gênica (Furuta *et al.*, 2008). Esses dados indicam que esses sítios CpG são importantes para a atividade transcricional do *TLR2* e, portanto, devem estar livres de metilação.

Assim como o promotor do gene *IL8*, e em contraste com o promotor do *TLR2*, o promotor do gene *TLR4* não contém sequências repetidas de nucleotídeos CpG, não representando portanto uma ilha CpG. Os dinucleotídeos CpG são esparsos e há a presença de TATA *box* que está localizada próxima aos sítios CpG estudados.

Nossas análises mostraram que esse promotor apresenta alta porcentagem de desmetilação nas células epiteliais da mucosa bucal e nas células do tecido gengival a porcentagem é ainda maior. Não foram observadas diferenças no padrão de metilação entre os grupos saudáveis e periodontite crônica. Entretanto, diferença significativa foi observada dentro dos grupos periodontite crônica quando os dados da mucosa bucal foram comparados com os dados do tecido gengival. A frequência de desmetilação foi maior para o tecido gengival. O sítio CpG investigado no gene *TLR4* apresenta sequência consenso com o sítio CpG que apresentou alta porcentagem de desmetilação no gene *TLR2* e possui sequência reconhecida pela enzima *Aci* I. Como descrito anteriormente, este sítio favorece a ligação do fator de transcrição Sp-1.

As diferenças observadas no padrão de metilação entre as células epiteliais da mucosa bucal e células do tecido gengival dos grupos periodontite sugerem que a desmetilação do *TLR4* poderia ser um dos fatores que potencializa a expressão deste receptor no tecido gengival durante a periodontite. Recente estudo observou que as células do tecido gengival expressam maior quantidade de receptores Toll-like do que as células do epitélio bucal durante a periodontite (Beklen *et al.*, 2008).

O TLR-4 é um receptor que participa de uma cascata de reações de sinalização celular, começando com o reconhecimento de LPS e culminando na ativação de proteínas da família de NF- κ B. Estas por sua vez, participam da ativação de vários genes envolvidos nas respostas imune inata e adaptativa. Se a relação entre desmetilação e ativação da transcrição gênica, for verdadeira para esse gene, a desmetilação no promotor do *TLR4* pode estar potencializando a expressão do receptor que ativa uma das principais vias de ativação de NF- κ B (Li & Verma, 2002). De fato, recentemente, um estudo *in vitro* demonstrou que a expressão gênica de *TLR4* é regulada epigeneticamente, inclusive pela metilação de DNA (Takahashi *et al.*, 2009). Em adição, esse receptor desenvolve papel dominante na sinalização pelo LPS (Poltorak *et al.*, 1998; Arbour *et al.*, 2000; Uehara *et al.*, 2002).

Alterações no Padrão de Metilação, Inflamação e Doença Periodontal

No início deste projeto esperávamos encontrar resultados relacionando o hábito de fumar com as modificações dos perfis de metilação. Curiosamente não foi observada a interferência do fumo no padrão de metilação em nenhum dos genes estudados. O fumo é conhecido como indutor de desmetilação (Smith *et al.*, 2007). As diferenças no padrão de metilação observadas entre os grupos saudável e periodontite foram independentes do hábito de fumar. Estudos prévios também mostraram resultados inconclusivos em relação ao risco do fumo na predisposição para alterações epigenéticas em câncer de pulmão (Guo *et al.*, 2004). Outros autores sugeriram que uma clara associação entre o padrão de

metilação em certos genes e o tabaco talvez seja observada somente em fumantes há mais de 50 anos e que começaram a fumar desde muito cedo.

Mas sendo a periodontite uma doença infecciosa devemos ressaltar a relação entre a microbiota local e as alterações no padrão de metilação induzido pela infecção, que tem sido reportada em algumas doenças. O LPS, potente agente inflamatório presente em alguns microrganismos que causam a periodontite, foi mostrado como indutor de metilação *de novo* em sítios CpG de células embrionárias de ratos (Tatemichi *et al.*, 2008), e em linhagens de células epiteliais de tumores gástricos (Katayama *et al.*, 2009). No presente estudo proporções de metilação foram encontradas também nas células do grupo saudável e recentes estudos mostraram que *P. gingivalis* coloniza tecidos bucais sem a presença necessária da doença periodontal (Rudney & Chen, 2006; Colombo *et al.*, 2007).

Um dos melhores exemplos entre a associação da presença de bactéria e alterações no padrão de metilação é a infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). A infecção por essa bactéria aumenta o risco ao desenvolvimento de tumores na mucosa gástrica e isto tem sido associado à presença de alterações epigenéticas em genes importantes para o desenvolvimento de tumores, incluindo metilação no gene *CDH1* que expressa a proteína E-caderina (Ushijima, 2007). Um recente estudo demonstrou que tumores positivos para HPV também foram associados ao aumento de metilação em genes protetores importantes (Richards *et al.*, 2009).

Autores reportaram que a hipermetilação provocada no promotor do gene *CDH1* pode ser mediada pela expressão de IL-1 β (Qian *et al.*, 2007). A expressão de IL-1 β está aumentada na presença de infecção pelo *H. pylori* e alguns estudos postulam que esta citocina teria um efeito regulatório diferencial sobre a expressão de duas classes de metiltransferases (Veluthakal *et al.*, 2006). IL-1 β parece ativar a produção de metiltransferase via produção de óxido nítrico (Hmadcha *et al.*, 1999), sendo este produzido pela enzima óxido nítrico sintase, que está superexpressa na presença de *H. pylori* (Fu *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2000). Assim, *H. pylori* poderia induzir metilação em E-caderina pelo aumento na

expressão de metiltransferases via IL-1 β e iNOS. A cascata de eventos que ocorre na infecção pelo *H.pylori* se assemelha muito com as etapas do processo inflamatório que acontecem durante a periodontite, sendo a IL-1 β uma citocina chave no processo da doença periodontal.

Pouco ainda se sabe sobre o papel da inflamação nas alterações epigenéticas e se esta seria a causa ou apenas uma consequência das alterações no padrão de metilação. Segundo alguns autores, a inflamação crônica poderia predispor ao desenvolvimento de certos tumores via alterações epigenéticas (Hahn *et al.*, 2008). No câncer colorretal, a presença de inflamação é reconhecidamente considerada um fator de risco para o desenvolvimento do tumor (Rutter *et al.* 2004). O processo inflamatório gera stress oxidativo nas células do tecido afetado. A produção de espécies reativas de oxigênio pode danificar proteínas, lipídeos e DNA. Neste último elas podem acontecer na forma de mutações, deleções, alterações no açúcar das bases, halogenação ou oxidação de citosinas. Citosinas 5-halogenadas podem causar inapropriada metilação *de novo* uma vez que a DNMT1 não é capaz de distinguir citosina metilada de citosina halogenada (Valinluck *et al.*, 2006; Valinluck & Sowers, 2007b). Já a oxidação da citosina leva à desmetilação do DNA. A oxidação dos grupos metil muda a conformação da 5-metilcitosina para hidroximetilcitosina, tornando-a irreconhecível pela DNMT1, o que, após a mitose, leva à perda de metilação (Valinluck & Sowers, 2007a). Sendo esta hipótese verdadeira, a inflamação seria um agente capaz de modificar epigeneticamente a cromatina, e todo tecido inflamado cronicamente estaria predisposto a estas alterações. Assim, o papel da inflamação periodontal no desenvolvimento de alterações epigenéticas em células da mucosa bucal e tecido gengival não deve ser descartado.

Relevância Clínica

O diagnóstico da doença periodontal é ligado a uma combinação de fatores associados que criam o fenótipo clínico. A arquitetura biológica desse fenótipo inclui resposta imuneinflamatória contra a microbiota do biofilme bucal, que é

orquestrada pela composição genética e epigenética individual. Alteração no padrão de metilação representa um evento epigenético que modifica a transcrição gênica drasticamente.

Muitos autores têm reportado padrão de metilação aberrante em genes associados ao câncer, e há crescentes evidências de que a metilação de DNA é crítica para regular a resposta inflamatória de uma maneira dinâmica. O presente estudo investigou o padrão de metilação de genes associados ao reconhecimento de patógenos orais e destruição do tecido periodontal durante a inflamação. Alguns resultados mostram alterações no padrão de metilação em células bucais afetadas pela periodontite crônica e isso pode trazer novos *insights* do papel da inflamação na biologia oral. Pode também, ajudar a entender os eventos moleculares que estão ocorrendo nas células bucais e no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e tratamento.

7. CONCLUSÕES

- 1- Nas células epiteliais da mucosa bucal, os dinucleotídeos CpG investigados no promotor do gene *IL8* apresentam maior desmetilação nos grupos afetados pela periodontite, tanto em fumante como em não fumante. Possivelmente esse mecanismo possa ser um dos fatores que participa do processo da doença e, portanto, importante na etiologia e patogênese da doença periodontal.
- 2- O nível de transcritos de *IL8* é significativamente maior nos grupos afetados pela periodontite, entretanto, não há associação direta entre desmetilação e aumento da expressão.
- 3- Não foi observada diferença no padrão de metilação dos dinucleotídeos CpG investigados no promotor do gene *TLR2* entre os diferentes grupos, tanto para células epiteliais da mucosa bucal quanto para células do tecido gengival. Porém, observamos que em alguns dinucleotídeos CpG a metilação não estava presente em 100% das células e/ ou alelos.
- 4- Não foi observada diferença no padrão de metilação dos dinucleotídeos CpG investigados no promotor do gene *TLR4* entre os diferentes grupos, tanto para células epiteliais da mucosa bucal quanto para células do tecido gengival. Entretanto nos grupos afetados pela periodontite a diferença no padrão encontrado entre as células da mucosa bucal e as células do tecido gengival foi significativa. Possivelmente esse mecanismo possa ser um dos fatores que participa do processo da doença e, portanto, importante na etiologia e patogênese da doença periodontal.

REFERÊNCIAS *

Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000; 406(6797): 782–87.

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.

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001; 2(8): 675–80.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(7): 499-511.

Allis D, Jenuwein T, Reinberg D. *Epigenetics.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.

Anway MD, Leathers C, Skinner MK. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology*. 2006; 147(12): 5515–23.

Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M *et al*. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*. 2000; 25(2): 187-91.

Asai Y, Ohyama Y, Gen K, Ogawa T. Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2. *Infect Immun*. 2001; 69(12): 7387– 95.

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

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

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; 11(5): 1242-53.

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

- Beklen A, Hukkanen M, Richardson R, Konttinen YT. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1–10 in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(5): 425-31.
- Beklen A, Sorsa T, Konttinen YT. Toll-like receptors 2 and 5 in human gingival epithelial cells co-operate with T-cell cytokine interleukin-17. *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24(1): 38-42.
- Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(16): 2395-402.
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 1986; 321(6067): 209-13.
- Blanco D, Vicent S, Fraga MF, Fernandez-Garcia I, Freire J, Lujambio A *et al*. Molecular analysis of a multistep lung cancer model induced by chronic inflammation reveals epigenetic regulation of p16 and activation of the DNA damage response pathway. *Neoplasia*. 2007; 9(10), 840-52.
- Bjornland K, Buo L, Scott H, Konttinen Y, Johansen HT, Aasen AO. Polymorphonuclear elastase in human colorectal carcinoma. *Int J Oncol*. 1998; 12(3): 535-40.
- Bostrom L, Bergstrom J, Dahlen G, Linder LE. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2001; 28(3): 212-9.
- Chanez P, Enander I, Jones I, Godard P, Bousquet J. Interleukin-8 in bronchoalveolar lavage of asthmatic and chronic bronchitis patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996; 111(1): 83-88.
- Colombo AV, da Silva CM, Haffajee A, Colombo AP. Identification of intracellular oral species within human crevicular epithelial cells from subjects with chronic periodontitis by fluorescence in situ hybridization. *J Periodontal Res*. 2007; 42(3): 236-43.
- 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.
- Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR *et al*. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun*. 2004; 72(9): 5041–51.

DeForge LE, Fantone JC, Kenney JS, Remick DG. Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin-8 production in human whole blood. *J Clin Invest.* 1992; 90(5): 2123-29.

De Larco JE, Wuertz BR, Yee D, Rickert BL & Furcht L. T Atypical methylation of the interleukin-8 gene correlates strongly with the metastatic potential of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(24): 13988-93.

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

Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(2): 143-53.

Foekens JA, Ries C, Look MP, Gippner-Steppert C, Klijn JG, Jochum M. The prognostic value of polymorphonuclear leukocyte elastase in patients with primary breast cancer. *Cancer Res.* 2003; 63(2): 337-41.

Fu S, Ramanujam KS, Wong A, Fantry GT, Drachenberg CB, James SP. *et al.* Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology.* 1999; 116(6): 1319-29.

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.

Furuta T, Shuto T, Shimasaki S, Ohira Y, Suico MA, Gruenert DC *et al.* DNA demethylation-dependent enhancement of toll-like receptor-2 gene expression in cystic fibrosis epithelial cells involves SP1-activated transcription. *BMC Mol Biol.* 2008; 9:39.

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.

Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature.* 1991; 351(6325): 355-6.

Giannopoulou C, Kamma J, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(2): 145-53.

- Griffith JS, Mahler HR. DNA ticketing theory of memory. *Nature*. 1969; 223(5206): 580-2.
- Guo M, Akiyama Y, House MG, Hooker CM, Heath E, Gabrielson E *et al*. Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(23): 7917-24.
- Haehnel V, Schwarzfischer L, Fenton MJ, Rehli M. Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages. *J Immunol*. 2002; 168(11): 5629-37.
- Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microflora. *J Clin Periodontol*. 2001; 28(5): 377-88.
- Hahn MA, Hahn T, Lee DH, Esworthy RS, Kim BW, Riggs AD *et al*. Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. *Cancer Res*. 2008; 68(24): 10280-9.
- Harrison J, Stirzaker C, Clark SJ. Cytosines Adjacent to Methylated CpG Sites Can Be Partially Resistant to Conversion in Genomic Bisulfite Sequencing Leading to Methylation Artifacts. *Anal Biochem*. 1998; 264 (1): 129-32.
- Henikoff S, Matzke MA. Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends Genet*. 1997; 13(8): 293-5.
- Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC *et al*. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun*. 2001; 69(3):1477-82.
- Hmadcha A, Bedoya FJ, Sobrino F, Pintado E. Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1beta via nitric oxide production. *J Exp Med*. 1999; 190(11): 1595-604.
- Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975; 187(4173): 226-32.
- Holliday R. The Inheritance of Epigenetic Defects. *Science*. 1987; 238(4824): 163-70.
- Hornef MW, Bogdan C. The role of epithelial Toll-like receptor expression in host defense and microbial tolerance. *J. Endotoxin Res*. 2005; 11(2): 124-8.
- Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol* 2004; 75(2): 196-209.

Johnson CM, Tapping RI. Microbial products stimulate human Toll-like receptor 2 expression through histone modification surrounding a proximal NF-kappaB-binding site. *J Biol Chem*. 2007; 282(43): 31197-205.

Kajita K, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H *et al*. Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon- α 1 in gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22(6): 398-402.

Katayama Y, Takahashi M, Kuwayama H. *Helicobacter pylori* causes runx3 gene methylation and its loss of expression in gastric epithelial cells, which is mediated by nitric oxide produced by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 388(3): 496-500.

Kikkert R, Laine ML, Aarden LA, van Winkelhoff AJ. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22(3): 145-51.

Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S. Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *J Dent Res*. 2009; 88(8): 741-5.

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

Kumar R, Yoneda J, Bucana CD, Fidler IJ. Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int J Oncol* 1998; 12(4): 749-57.

Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedachi M, Nozaki T *et al*. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. *J Periodontol*. 2004; 75(3): 370-9.

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

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

Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(10): 725-34.

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

- Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009 [Epub ahead of print]
- 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.
- Magnusson I, Walker CB. Refractory periodontitis or recurrence of disease. *J Clin Periodontol*. 1996; 23(3): 289-92.
- Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*. 2007; 43: 41-55.
- Medzhitov R, Janeway Jr C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*. 2000a; 173: 89-97.
- Medzhitov R, Janeway Jr C. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol*. 2000b; 8(10): 452-6.
- Meyer MS, Joshipura K, Giovannucci E, Michaud DS. A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease, and cancer. *Cancer Causes Control*. 2008; 19(9): 895-907.
- Mochizuki S, Kobayashi M, Suzuki T, Oikawa A, Koseki T, Nishihara T *et al.* Gamma-interferon enhances expression of CD14/MyD88 and subsequent responsiveness to lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2004; 39(5): 333-43.
- Murdoch C, Monk PN, Finn A. CXC chemokine receptor expression on human endothelial cells. *Cytokine*. 1999; 11(9): 704-12.
- Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006; 40: 11-28.
- Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. Rethinking periodontal inflammation. *J Periodontol*. 2008; 79(8 Suppl): 1577-84.
- Opdenakker G, Van den Steen PE, 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.
- 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.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X *et al*. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *tlr4* gene. *Science* 1998; 282 (5396): 2085-88.
- Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene*. 2001; 269(1-2): 1-12.
- Qian ZR, Sano T, Yoshimoto K, Asa SL, Yamada S, Mizusawa N. *et al*. Tumor-specific downregulation and methylation of the CDH13 (H-cadherin) and CDH1 (E-cadherin) genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas. *Mod Pathol*. 2007; 20(12): 1269-77.
- Remick DG. Interleukin-8. *Crit Care Med*. 2005; (12 Suppl): S466-7.
- Remick DG, DeForge LE, Sullivan JF, Showell HJ. Profile of cytokines in synovial fluid specimens from patients with arthritis. Interleukin-8 (IL-8) and IL-6 correlate with inflammatory arthritides. *Immunol Invest*. 1992; 21(4): 321-7.
- Richards KL, Zhang B, Baggerly KA, Colella S, Lang JC, Schuller DE *et al*. Genome-wide hypomethylation in head and neck cancer is more pronounced in HPV-negative tumors and is associated with genomic instability. *PLoS One*. 2009; 4(3): e4941.
- Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet*. 1975; 14(1): 9-25.
- Roach HI, Yamada N, Cheung KS, Tilley S, Clarke NM, Oreffo RO *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.
- Rudney JD, Chen R. The vital status of human buccal epithelial cells and the bacteria associated with them. *Arch Oral Biol* 2006; 51(4): 291-98.
- Russo AL, Thiagalingam A, Pan H, Califano J, Cheng KH, Ponte JF *et al*. Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stage-specific 45 tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(7): 2466-70.

- Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M *et al.* Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2004; 126(2): 451-9.
- Sager R, Kitchin R. Selective silencing of eukaryotic DNA. *Science*. 1975; 189(4201): 426-33.
- Salnikow K, Costa M. Epigenetic mechanisms of nickel carcinogenesis. *J. Environ. Pathol Toxicol Oncol*. 2000; 19(3): 307-18.
- Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000. 1997; 14: 173-201.
- 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.
- 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.
- Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S *et al.* Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet*. 2007; 3(10): 2023-36.
- Shiao YH, Crawford EB, Anderson LM, Patel P, Ko K. Allele-specific germ cell epimutation in the spacer promoter of the 45S ribosomal RNA gene after Cr(III) exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 205(3): 290–296.
- 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.
- Smith IM, Mydlarz WK, Mithani SK, Califano JA. DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. *Int J Cancer*. 2007; 121(8): 1724-8.
- Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP 3rd, Toews GB *et al.* Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest*. 1990; 86(6): 1945-53.
- Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med*. 2002; 4(4): 1-17

- Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet.* 2004; 36(5): 497-501.
- Tao L, Yang S, Xie M, Kramer PM, Pereira MA. Effect of trichloroethylene and its metabolites, dichloroacetic acid and trichloroacetic acid, on the methylation and expression of c-Jun and c-Myc protooncogenes in mouse liver: prevention by methionine. *Toxicol Sci.* 2000;54(2): 399-407.
- Takahashi K, Sugi Y, Hosono A, Kaminogawa S. Epigenetic regulation of TLR4 gene expression in intestinal epithelial cells for the maintenance of intestinal homeostasis. *J Immunol.* 2009; 183(10): 6522-9.
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(6): 3740-5.
- Takiguchi M, Achanzar WE, Qu W, Li G, Waalkes MP. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp Cell Res.* 2003; 286: 355-65.
- Tatemichi M, Hata H, Tazawa H, Nakadate T. Lipopolysaccharide induces aberrant hypermethylation of Hic-1 in mouse embryonic fibroblasts lacking p53 gene. *Anticancer Res.* 2008; 28(4B): 2101-8.
- 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.
- Uehara A, Sugawara S, Takada H. Priming of human oral epithelial cells by interferon-gamma to secrete cytokines in response to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans. *J Med Microbiol.* 2002; 51(8): 626-34.
- Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in Human Gingival Fibroblasts. *J Dent Res.* 2007; 86(3): 249-54.
- Ushijima T. Epigenetic Field for Cancerization. *J Biochem Mol Biol.* 2007; 40(2): 142-50.
- Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 2007a; 67(3): 946-50.

Valinluck V, Sowers LC. Inflammation-Mediated Cytosine Damage: A Mechanistic Link between Inflammation and the Epigenetic Alterations in Human Cancers. *Cancer Res.* 2007b; 67(12): 5583-86.

Valinluck V, Wu W, Liu P, Neidigh JW, Sowers LC. Impact of cytosine 5-halogens on the interaction of DNA with restriction endonucleases and methyltransferase. *Chem Res Toxicol.* 2006; 19(4): 556-62.

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.

Veluthakal R, Jangati GR, Kowluru A. IL-1beta-induced iNOS expression, NO release and loss in metabolic cell viability are resistant to inhibitors of ceramide synthase and sphingomyelinase in INS 832/13 cells. *J Periodontol.* 2006; 7(6): 593-601.

Veurink M, Koster M, Berg LT. The history of DES, lessons to be learned. *Pharm World Sci.* 2005; 27(3): 139-143.

Vlodavsky I, Fuks Z, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Levi E, Korner G *et al.* Extracellular matrix-resident basic fibroblast growth factor: implication for the control of angiogenesis. *J Cell Biochem.* 1991; 45(2): 167-76.

Waddington C. The epigenotype. *Endeavour.* 1942; 118–20.

Wade AP. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays.* 2001; 23(12): 1131-7.

Wang T, Lafuse WP, Zwilling BS. NFkappaB and Sp1 elements are necessary for maximal transcription of toll-like receptor 2 induced by *Mycobacterium avium*. *J Immunol.* 2001; 167(12): 6924-32.

Watanabe S, Takagi A, Koga Y, Kamiya S, Miwa T. *Helicobacter pylori* induces apoptosis in gastric epithelial cells through inducible nitric oxide. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 15(2): 168-74.

Waterland RA. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *J Nutr.* 2006; 136(6): 1706S–1710S.

Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(15): 5293-5300.

- Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL *et al.* Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet.* 2005; 37(8): 853-62.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M. *et al.* Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* 2007; 39(4): 457-66.
- Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science.* 1999; 286(5439): 481-6.
- Yoshimura A, Hara Y, Kaneko T, Kato I. Secretion of IL-1b, TNF-a, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes is response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res.* 1997; 32(3): 279-86.
- Yoshimura A, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y. Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human toll-like receptor 4. *Infect Immun.* 2002; 70(1): 218-25.
- Yucel-Lindberg T, Brunius G. Epidermal growth factor synergistically enhances interleukin-8 production in human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 β . *Arch Oral Biol.* 2006; 51(10): n892-8.
- Zeilhofer HU, Schorr W. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Curr Opin Hematol.* 2000; 7(3): 178-82.
- Zeisel SH. Importance of methyl donors during reproduction. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(2): 673S-7S.
- Zhu JK. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet.* 2009; 43: 143-66.



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, iNOS, TLR-2, P53 e P21 em células do ligamento periodontal e sangue periférico de indivíduos fumantes e não-fumantes com periodontite crônica e em indivíduos com periodontite agressiva"**, protocolo nº 172/2006, dos pesquisadores Ana Paula de Souza Pardo, Denise Carleto Andia, 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 15/06/2009.

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, iNOS, TLR-2, P53 and P21 in periodontal ligament cells and blood cells of smoking and non-smoking subjects with chronic periodontitis and aggressive periodontitis ."**, register number 172/2006, of Ana Paula de Souza Pardo, Denise Carleto Andia, 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 .

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
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.



**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 IL8, MMP1,
MMP2, MMP3, MMP9, TIMP2, TIMP3, iNOS, TLR-2, P53 e P21 EM CÉLULAS BUCAIS E
SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS FUMANTES E NÃO FUMANTES COM
PERIODONTITE CRÔNICA E INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE AGRESSIVA**

1. INTRODUÇÃO: Leia este termo cuidadosamente, pois o mesmo visa convidá-lo a participar de uma pesquisa, sendo que 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, a doutoranda Denise Carleto Andia ou a doutoranda Naila Francis Paulo de Oliveira, do Departamento de Morfologia da FOP/UNICAMP; Fone: (19) 2106-5214/ 2106-5381.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO DA PESQUISA:

Esta pesquisa terá como objetivo estudar o padrão de metilação (presença do grupo químico CH₃ em alguns pontos do DNA, que é a molécula que guarda nossas informações dentro da célula) encontrados em alguns genes ligados à destruição tecidual durante a doença periodontal, que são problemas de gengiva que podem levar à perda dos dentes. **Você deve decidir se deseja ou não colaborar com esta pesquisa, entendendo-a o suficiente para fazer uma decisão consciente.** Este tipo de pesquisa é importante e justificável porque trará avanços no conhecimento da história da doença periodontal que poderão contribuir no futuro com avanços no tratamento da periodontite. 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:

PERIODONTITE AGRESSIVA- Irão participar deste estudo pacientes adultos, do sexo feminino e masculino, com idade entre 18 e 35 anos, não fumantes (nunca fumaram), que apresentam doença periodontal agressiva generalizada 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.

PERIODONTITE CRÔNICA- Participarão 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 apresentavam doença periodontal crônica em grau moderado a severo e que estavam em tratamento periodontal na Clínica de Especialização em Periodontia da FOP-UNICAMP. Não haverá nenhum custo adicional ao paciente decorrente da pesquisa.

Grupo que o voluntário se enquadra:

- () controle
- () periodontite crônica
- () periodontite agressiva

DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS:

PERIODONTITE AGRESSIVA- Serão coletadas células de um bochecho com dextrose a 3% (um açúcar) autoclavada (solução estéril). O exame clínico e radiográfico, necessários à classificação da doença periodontal do paciente, serão os mesmos já realizados pelo Cirurgião Dentista que está tratando o paciente, portanto, o paciente não deverá comparecer à clínica exclusivamente por conta da pesquisa. No laboratório do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP - Unicamp, o DNA destas células será purificado e analisado pela técnica MSP-PCR, que detecta possíveis alterações químicas no DNA. Se alterações forem encontradas, **elas não irão significar doença**, apenas variações entre os indivíduos que poderão indicar quem possui pré-disposição à doença periodontal ou quem possui pré-disposição à proteção contra a doença periodontal. Os resultados encontrados nas células dos indivíduos participantes da pesquisa serão então comparados para sabermos se existem diferenças significantes entre quem apresenta periodontite e quem não apresenta periodontite. Haverá a participação de um grupo controle que será formado por indivíduos que apresentam ótimas condições de saúde bucal e, portanto, não apresentam a doença periodontal. Não há a possibilidade de inclusão em grupo placebo nem a possibilidade de métodos alternativos para a obtenção dos resultados.

PERIODONTITE CRÔNICA- Serão coletadas células do instrumental do dentista, 10 mL de sangue venoso da veia radial e um bochecho com dextrose a 3% autoclavada. O sangue servirá como material controle do indivíduo. No laboratório do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP - Unicamp, o DNA destas células será purificado e analisado pela técnica chamada MSP-PCR, que detecta possíveis alterações químicas no DNA. Os resultados encontrados nas células de indivíduos fumantes e não fumantes serão então comparados para sabermos se existem diferenças. Se alterações forem encontradas, **elas não irão significar doença**, apenas variações entre os indivíduos que poderão indicar quem possui pré-disposição à doença periodontal ou quem possui pré-disposição à proteção contra a doença periodontal. Os resultados encontrados nas células dos indivíduos participantes da pesquisa serão então comparados para sabermos se existem diferenças significantes entre quem apresenta periodontite e quem não apresenta periodontite. Haverá a participação de um grupo controle que será formado por indivíduos que

apresentam ótimas condições de saúde bucal e, portanto, não apresentam a doença periodontal. Não há a possibilidade de inclusão em grupo placebo nem a possibilidade de métodos alternativos para a obtenção dos resultados.

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 mestrande 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 tornam 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

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 e não os nomes dos pacientes. 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, inclusive com relação ao seu tratamento odontológico.

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, Denise Carleto Andia ou Naila Francis Paulo de Oliveira, 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 pode concordar ou não com esta condição:

() Sim, concordo em permitir que o material biológico, que será coletado com meu consentimento, faça parte de um Banco de Material Biológico.

() Não, não permito que o material biológico, que será coletado com meu consentimento, faça parte de um Banco de Material Biológico.

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 com a aluna de pós-graduação Denise Carleto Andia ou Naila Francis Paulo de Oliveira no Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, Av. Limeira 901, Piracicaba-SP. Fone: (019) 2106-5214. E-mail: denise@fop.unicamp.com.br / naila_francis@yahoo.com.br

Em caso de dúvida sobre seus direitos como voluntário da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOP/Unicamp, 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, ____ de _____ de 200_.

_____ RG

_____ Telefone

Assinatura do paciente

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 (não aceitar ex-fumante por mais de 5 anos)

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? _____

Frequência de Doença Periodontal _____

Doença Periodontal na família? S N Frequência _____

Fumante na Família? S N

OBSERVAÇÕES:

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

Sangramento Gengival S N

Tártaro: S N

DNA methylation status of the *IL8* gene promoter in oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis

Naila F. P. Oliveira¹, Gilcy R. Damm¹,
Denise C. Andia¹, Cristiane Salmon²,
Francisco H. Nociti Jr.², Sérgio R. P.
Line¹ and Ana Paula de Souza¹

¹Laboratory of Molecular Biology, Department of Morphology, Division of Histology, School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas-UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil; ²Department of Prosthodontics/Periodontics, Piracicaba Dental School, University of Campinas-UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil

Oliveira NFP, Damm GR, Andia DC, Salmon C, Nociti FH Jr., Line SRP, de Souza AP. DNA methylation status of *IL8* gene promoter in oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 719–725. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01446.x.

Abstract

Aim: This study analysed the status of DNA methylation in the promoter region of the *IL8* gene in oral mucosa cells from healthy, smoker and non-smoker subjects with chronic periodontitis and compared these findings among groups with mRNA levels.

Material and Methods: Genomic DNA from epithelial oral cells of 41 healthy subjects, 30 smokers with chronic periodontitis and 40 non-smokers with chronic periodontitis were purified and modified by sodium bisulphite. Genomic DNA from blood leucocytes and gingival cells from biopsies of 13 subjects of each group were also purified and modified by sodium bisulphite. Modified DNA was submitted by methylation-specific polymerase chain reaction (PCR) (MSP), electrophoresed on 10% polyacrylamide gels and stained with SYBR Gold. Total RNA from gingival cells was also isolated using the TRIzol reagent, and real-time PCR performance was used to detect the levels of interleukin-8 mRNA.

Results: Our results indicate that individuals with chronic periodontitis, independent of smoking habit, have a higher percentage of hypomethylation of the *IL8* gene than those controls in epithelial oral cells ($p < 0.0001$), and expression of higher levels of interleukin-8 (*IL-8*) mRNA than controls in gingival cells ($p = 0.007$). No significant differences among groups were observed in gingival cells and blood cells.

Conclusion: We conclude that inflammation in the oral mucosa might lead to changes in the DNA methylation status of the *IL8* gene in epithelial oral cells.

Key words: epigenetic; *IL-8*; inflammation; methylation; periodontitis; smokers

Accepted for publication 31 May 2009

Chronic periodontitis is an infectious disease characterized by a destructive inflammatory process that affects the

supporting tissues of the tooth, and promotes loss of the soft connective tissues and alveolar bone (Williams 1990). These events are dependent on a combination of associated factors, including the individual's genetic and epigenetic characteristics, which creates the clinical phenotype.

The early stage of periodontal disease is characterized by an intense accumulation of inflammatory cells in the gingival tissue (Williams 1990, Seymour et al. 1996), which contribute to later degenerative events. It is recognized

that interleukin-8 (*IL-8*) is one of the most potent factors responsible for inducing neutrophil chemotaxis, directing the migration of these cells to the inflammation site (Remick 2005). *IL-8* is constitutively produced and secreted by a wide range of cells such as macrophages, monocytes, fibroblasts and epithelial cells. The production of *IL-8* can be induced by multiple stimuli including lipopolysaccharide (LPS), live bacteria and early proinflammatory cytokines (Remick 2005). *IL-8* seems to play a relevant role in tissue destruction

Conflict of interest and source of funding statement

There are no conflicts of interest associated with this work.

This study was supported by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP – 07/02488-0 and 07/00367-0). Oliveira was supported by the National Council of Research (CNPq-141592/2007-9).

in periodontal disease. High levels of IL-8 mRNA were observed in a culture of human gingival fibroblasts after treatment with IL-1 β and epidermal growth factor, showing that these cells are able to respond after stimuli, releasing IL-8 (Yucel-Lindberg & Brunius 2006). The production of this cytokine is stimulated by periodontopathogens (Gursoy et al. 2008), and the levels of IL-8 are increased in the crevicular fluid and tissues in patients with periodontitis (Tsai et al. 1995, Gamonal et al. 2000, 2001).

DNA methylation is a crucial mechanism in the control of gene activity and nuclear architecture. Dinucleotides CpG "methylable" are not randomly distributed in the human genome; they appear in CpG-rich regions denominated as CpG islands, which are present in the promoters of many genes. Some transcriptional factors (i.e., Sp1) can interact only with non-methylated DNA sequences, whereas methylation of cytosine abolishes interactions (Clark et al. 1997). This in turn leads to less effective transcription of certain genes or even silences the gene. Thus, methylation defects include genome hypomethylation (resulting in epigenetic activation of proto-oncogenes and retroelements) and localized aberrant hypermethylation of CpG islands, resulting in transcriptional repression of many important genes as tumour suppressor genes (Ting et al. 2006).

Several authors have reported an aberrant methylation status in genes associated with oral cancer (Kulkarni & Saranath 2004, Kato et al. 2006), lung cancer (Blanco et al. 2007), oesophageal cancer (Eads et al. 2001, Guo et al. 2006, Ishii et al. 2007) colon cancer (Lee et al. 2004, Takahashi et al. 2006) and gastric cancer (Esteller et al. 2001a; Kang et al. 2003a; Chang et al. 2006).

Although alterations in the methylation pattern have been extensively implicated in cancer processes, recent studies have shown that changes in the methylation status of ILs and other inflammatory factors can modulate the inflammatory process (Abolhassani et al. 2008, Nile et al. 2008). In fact, aberrant methylation has been detected in some inflammatory diseases such as gastritis (Kang et al. 2003b), cystic fibrosis (Shuto et al. 2006, Furuta et al. 2008) and chronic kidney disease (Stenvinkel et al. 2007). It is also known that the expression of IL-8 can be modulated by the methylation status of its promoter (De Larco et al. 2003).

It is well known that smoking is a risk factor for periodontal disease (Brothwell 2001). Likewise, recent experimental studies have shown that tobacco smoking can alter the methylation status of gene promoters. Nicotine can directly induce methylation in DNA (Marsit et al. 2006, Soma et al. 2006). Additionally, changes in the promoter methylation of the TSLC1/IGSF4 tumour suppressor genes have been associated with a poor prognosis (Kikuchi et al. 2006). Therefore, the aim of the present study was to investigate the methylation status in the gene promoter of IL-8 in cells of the oral epithelium, gingival tissue and blood leucocytes of healthy subjects and to compare it with the findings in cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis. We also analysed the levels of IL-8 mRNA in these groups.

Material and Methods

Subject population

This study was approved by the Institutional Review Board of the Piracicaba Dental School, University of Campinas. All patients were informed about the nature of the proposed treatment, and informed consent forms were signed. A convenience sample of unrelated subjects >25 years old, male and female, was recruited for the study. The patients were from the Southeastern region of Brazil. All subjects were in good general health and had at least 20 teeth in the mouth. All subjects were subjected to anamnesis and to clinical and periodontal examination. Exclusion criteria included any systemic disorder that would affect the periodontal condition (with the exception of smoking), current pregnancy or lactation and patients who had used systemic antibiotics or anti-inflammatory medication within 6 mo before baseline. The smoking habit was recorded, and patients who had consumed five cigarettes/day for at least

5 years were classified as smokers. Only patients who had never smoked were included in the nonsmoker group. The diagnosis and classification of disease were made on the basis of clinical parameters and consisted of a physical examination, medical and dental history, probing depth, assessment of attachment loss [clinical attachment loss (CAL)], tooth mobility and observation of gingival bleeding on probing. Measurements of probing depth and attachment level were recorded at six points around each tooth. Subjects were included in clinical categories according to periodontal disease and smoking habit:

- (1) *Healthy group (never smoked)*: Subjects found to exhibit no signs of periodontal disease as determined by the absence of CAL and no sites with probing depth > 3 mm.
- (2) *Non-smoking chronic periodontitis (never smoked)*: Subjects with at least three teeth exhibiting sites ≥ 5 mm CAL, in at least two different quadrants.
- (3) *Smoking chronic periodontitis*: Subjects with at least three teeth exhibiting sites ≥ 5 mm CAL, at least two different quadrants and had consumed five cigarettes/day for at least 5 years.

Table 1 shows the clinical and demographic characteristics of the participants of the study.

Biopsy collection

Gingival biopsies were obtained from single teeth from subjects undergoing periodontal surgery for periodontal disease-related (test groups) and non-disease-related reasons (control group). Following blocks anaesthesia, tissues on the tooth surface where periodontal pockets were evaluated were incised to include the entire soft tissue walls of the pockets to be investigated. Entire pocket,

Table 1. Mean values and standard deviation for the clinical parameters in the selected sites, and demographic and behavioural data in smokers and non-smokers

	Control (n = 41)	Smokers (n = 30)	Non-smokers (n = 40)
Age (years)	46.2 $\pm$ 14.1	47.03 $\pm$ 6.49	44.94 $\pm$ 9.17
% men	33.4	55.8	40.5
% women	66.6	44.2	59.5
Probing depth (mm)		7.8 $\pm$ 2.02	7.9 $\pm$ 2.18
Cigarettes/day		15.6 $\pm$ 7.32	
Cigarette consumption (in years)		22.3 $\pm$ 9.26	

junctional epithelia and connective tissues were removed. Then, the samples were divided into groups.

DNA extraction and bisulphite modification

Samples of epithelial oral cells were collected by mouthwash with dextrose 3% and the DNA was purified using 8 M ammonium acetate and 1 mM EDTA according to Aidar & Line (2007). DNA from gingival cell were obtained from biopsies and stored in a tube containing RNAholder (Bioagency, São Paulo, SP, Brazil) and frozen at -70°C until analyses. Total DNA was purified using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's recommendation. DNA from leucocytes was purified after red cell haemolysis according to Aidar & Line (2007) to be used as an endogenous control of methylation status. Then, 1 μg of purified DNA was modified by sodium bisulphite, whose principle exploits the different sensitivities of cytosine and 5-methylcytosine (5-MeC) to deamination by bisulphite under acidic conditions, in which cytosine undergoes conversion to uracil while 5-MeC remains unreactive (Herman et al. 1996). DNA already modified by sodium bisulphite was purified the using Wizard SV Gel and polymerase chain reaction (PCR) Clean-Up System kit (Promega Corporations, Madison, WI, USA) and stored at -70°C . One sample was methylated *in vitro* using 3 U of the recombinant *SssI* CpG methylase (New England Biolabs, Mississauga, ON, USA) in the presence of 160 μM S-adenosylmethionine at 37°C overnight to serve as a control of the methylated reaction.

Methylation-specific PCR (MSP)

Differences in DNA sequences after treatment with sodium bisulphite were detected by MSP. A fragment of 173 bp was amplified with specific primers for either methylated (forward 5'-aaatttgcgtatattc3'/reverse 5'-ccgatacttttatcat3') or unmethylated (forward 5'-aaatttgcgtatattt3'/reverse 5'-tccaaacttttatcat3') targets (GenBank accession number M28130). Each MSP reaction incorporated 100 ng of bisulphite-modified DNA, 1 μM of each primer and 1 $\times$ Go Taq Green Master Mix (Promega Corporations) in a final reaction of 25 μL .

© 2009 John Wiley & Sons A/S

The methylated and unmethylated cycle conditions were as follows: $95^{\circ}\text{C} \times 5 \text{ min.}$; 30 cycles $\times$ ($95^{\circ}\text{C} \times 45 \text{ s.}$, $47^{\circ}\text{C} \times 45 \text{ s.}$, $72^{\circ}\text{C} \times 45 \text{ s.}$); and $72^{\circ}\text{C} \times 7 \text{ min.}$ Amplified PCR samples were carried on 10% polyacrylamide gels and subjected to electrophoresis. DNA bands were detected after SYBR Gold stain (Invitrogen).

Bisulfite sequencing

Some samples were subjected to automatic sequencing to verify the specific methylated and unmethylated amplified sequences. After MSP, fragments were eluted from agarose gel, purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega Corporations) following the manufacturer's recommendation and subjected to automatic sequencing in 20 μL containing 1 μL of DNA, 3 μM of sense primer and 8 μL of Big Dye Terminator Ready v2.0 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA).

RNA extraction

Gingival biopsies were collected and immediately stored in a tube containing RNAholder[®] (Bioagency) at room temperature for 24 h. Then samples were frozen at -70°C until analyses. Total RNA was purified using the TRIzol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's recommendation.

Real-time PCR

Reverse transcription

One microgram of total RNA was treated with DNase (Invitrogen) and 500 ng was used for cDNA synthesis. The reaction was carried out using the First-strand cDNA synthesis kit (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations.

Reverse transcription PCR

A fragment of 172 bp using specific primers (forward 5'-gccagagaatacgaac ttaatt3'/reverse 5'-ctggctagcagatagg3') was amplified by a quantitative PCR that was performed in the LightCycler[®] system (Roche Diagnostics GmbH, Indianapolis, IN, USA) using the Fast-Start DNA Master Plus SYBR Green kit (Roche Diagnostic GmbH). The reaction product was quantified using the Relative Quantification tool (LIGHT-CYCLES[®] Software 4; Roche Diagnos-

tics GmbH), with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as the reference gene.

Statistical analysis

The difference in the methylation status in the groups was compared by the χ^2 test at a level of 5%. With respect to gene expression analysis, an inter-group analysis was performed using the non-parametric Kruskal-Wallis test at the level of 5%, followed by Dunn's test when differences were detected. The linear correlation between methylation status and IL-8 expression was tested by the Spearman coefficient.

Results

Automatic sequencing confirmed the methylated and unmethylated sequences amplified by MSP (Fig. 1). The results of DNA purified from epithelial oral cells showed that the majority of individuals in the control group are positive for both conditions, methylated and unmethylated, in the *IL8* gene. However, a high percentage of subjects of the periodontitis groups, smokers and non-smokers have epithelial cells positive only to the unmethylated condition. Practically all subjects in the healthy control group were methylated in contrast to only 23% and 20% of subjects of periodontitis smoking and periodontitis non-smoking groups, respectively (Fig. 2). This occurred independent of age, and the difference between control

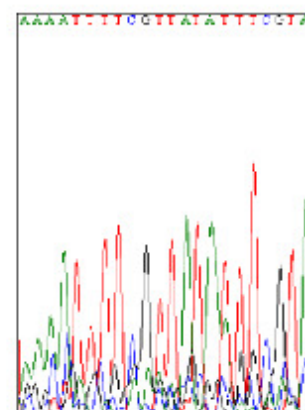


Fig. 1. CpG-methylated sites in the *IL8* promoter confirmed after automatic sequencing.

722 Oliveira et al.

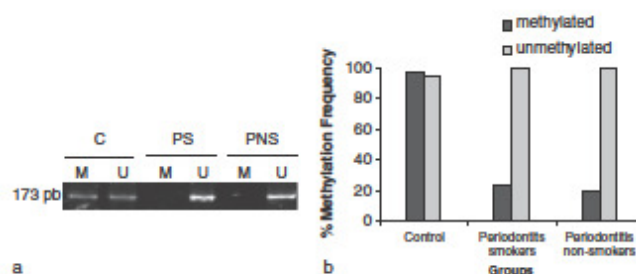


Fig. 2. (a) Bands of Interleukin-8 (IL-8) methylation-specific polymerase chain reaction. C, control; PS, periodontitis smokers; PNS, periodontitis non-smokers; M, methylated; U, unmethylated. (b) Methylation frequency of the *IL8* gene promoter in oral epithelial cells of healthy subjects and subjects with chronic periodontitis (control group, $N = 41$; periodontitis smokers $N = 30$; periodontitis non-smokers, $N = 40$).

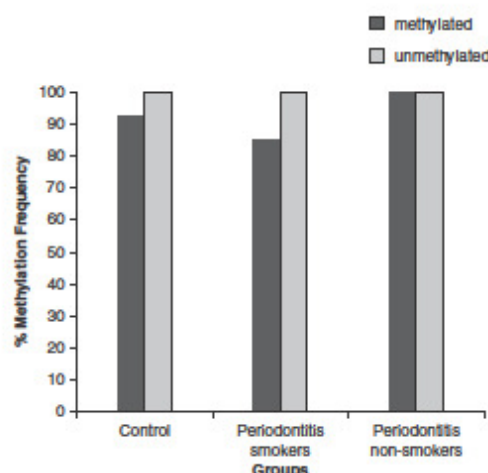


Fig. 3. Methylation frequency of the *IL8* gene promoter in gingival cells of healthy subjects and subjects with chronic periodontitis (control, $N = 13$; periodontitis smokers, $N = 13$; periodontitis non-smokers, $N = 13$).

and periodontitis groups was strongly significant ($p < 0.0001$; χ^2 test).

The same was not observed for DNA purified from gingival tissue cells and blood leucocytes. No difference was observed between the methylated and the unmethylated conditions for the *IL8* gene promoter. The majority of the subjects were positive for both conditions in the three different groups (Figs 3 and 4).

Data for gene expression analysis demonstrated that *IL-8* mRNA levels were higher in the periodontitis than in the healthy group (Fig. 5). This difference was statistically significant ($p = 0.007$; Kruskal-Wallis test).

Discussion

Epigenetics highlights how habits such as smoking and alcohol drink, diet, environment and infections may alter the tissue behaviour. Studies of DNA methylation patterns have emerged as an important field of research in several pathologies, if not all diseases including chronic periodontitis, because this event may modify the genetic transcription dramatically. The transcriptional repression caused by DNA methylation seems to be mediated by the methyl binding protein (MBP) family such as MeCP1 and MeCP2 (Wade 2001). While MeCP1 requires multiple methylated

CpG sites to bind to DNA and promote chromatin condensation, the MeCP2 protein is able to bind to only one methylated CpG site. It is known that the interaction between only one CpG site and DNA enhancer elements can be enough to modify gene transcription (Bird 1986). The promoter of *IL-8* is not a typical CpG island promoter as it does not contain repeat sequences of CpG dinucleotides. The CpG sites are sparse in the *IL8* gene promoter. It is worth mentioning that most studies on DNA methylation are focused on gene promoters containing multiple CpG sites and that the analysis of the methylation status in promoters containing sparse CpG sites has been largely neglected.

The CpG dinucleotides selected in the present study are located between nucleotides -136 and $+43$ of the *IL8* gene promoter. It contains a basal modulator transcription region, consisting of four *cis*-regulator elements, an NF- κ B (-82 to -70), a CCAAT/enhancer-binding protein (-94 to -84) and AP-protein (-126 to -120)-binding sites. The fourth *cis*-regulator element is located between nucleotides -90 and -83 , being activated by the Oct-1 factor, which down-regulates the *IL-8* transcription (de Larco et al. 2003). These sites are located near TATA and CCAAT boxes, which are important for the initiation of transcription.

Most individuals in the control group showed an *IL8* methylation status positive to both conditions, methylated and unmethylated, in epithelial oral cells, gingival tissue cells and blood cells, while a high frequency of periodontitis group individuals showed completely unmethylated epithelial oral cells. The differences between healthy and diseased individuals were probably due to the differential response of distinct cell types to products of bacterial infection or inflammation. While buccal mouthwashes contained mainly epithelial cells (Aidar & Line 2007), gingival tissues include not only epithelial cells but also fibroblasts, blood cells, macrophages and some other cell types. It is worth mentioning that basal cells that give rise to oral epithelium remain in the oral cavity during the individual's whole life, while connective tissue fibroblasts, inflammatory and blood cells present in periodontal tissues are continuously renewed. Thus, the long-term exposure of basal epithelial cells to bacterial products and inflammatory cytokines may be a possible cause of the specific

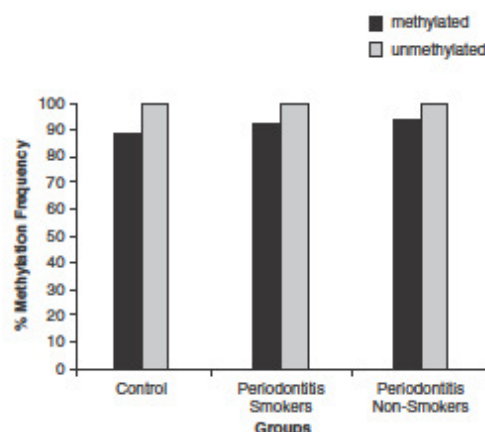


Fig. 4. Methylation frequency of the *IL8* gene promoter in leucocytes from the peripheral blood of healthy subjects and subjects with chronic periodontitis (control, $N = 13$; periodontitis smokers, $N = 13$; periodontitis non-smokers, $N = 13$).

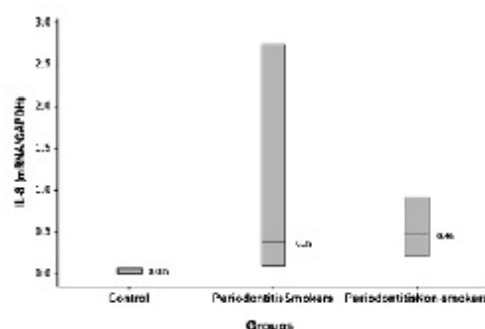


Fig. 5. Interleukin-8 mRNA levels from gingival cells of healthy subjects and subjects with chronic periodontitis (control, $N = 13$; periodontitis smokers, $N = 13$; periodontitis non-smokers, $N = 13$).

loss of methylation observed in this tissue. It is also important to mention that besides buccal epithelial cells, the salivary rinses could also contain some other cells such as neutrophils and monocytes, especially in patients with chronic periodontitis. It seems, however, that this is a minor contamination as it was not detected in the PCR reactions, where DNA was unmethylated.

The relationship between gene methylation and local pathogens has been reported. One of the examples is the association of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) presence and modified methylation status in gastric cancer. The *H. pylori* infection increases the risk of methylation in genes responsible

for tumour development, including transcription erasing of the *CDH1* gene (Ushijima 2007). In this context, oral infection may also lead to epigenetic alterations, locally within gingival tissue or more globally, with widespread effects (Offenbacher et al. 2008). The synthesis of IL8 can be regulated by virulence factors produced by bacterial cells. The synthesis of IL8 by human fibroblast cells is enhanced by the forsythia detaching factor, a cysteine protease produced by periodontopathogen *T. forsythia* (Tomi et al. 2008). Interestingly, incubation of oral epithelial cells with the *Porphyromonas gingivalis* virulence factors lysine-specific gingipain (Kgp) and high-molecular-mass

arginine-specific gingipain (HRgpA) resulted in a decrease in the production of IL8, while arginine-specific gingipain 2 (RgpB), from the same source, increased IL-8 production (Uehara et al. 2008). Therefore, it is plausible to assume that the methylation of IL8 and other cytokines, in diverse cell types present in gingival tissues, may be influenced by bacterial virulence factors. In fact, bacterial lipopolysaccharide, a known potent inflammatory agent, was shown to induce de novo methylation in the CpG sites of mouse embryonic cells (Tatemichi et al. 2008). We predict that future investigation on this subject may help to unravel the molecular mechanisms by which bacterial cells modulate periodontal inflammation.

Cigarette smoke is known to induce global hypomethylation (Smith et al. 2007). Interestingly, in the present study, smoking was not found to interfere with the loss of methylation in the cells collected in the mouthwash. Previous studies also shown inconclusive results on the risk of smoking on pre-disposed epigenetic modification in lung cancer (Guo et al. 2004). Other authors have suggested that a clear correlation between methylation status in certain genes and tobacco may only be observed in heavy smokers who have a tobacco history of more than 50 years and who started cigarette smoking at an early age.

Finally, we wonder whether tissue inflammation could be a consequence of the methylation status modifications or a cause of it. Fifty years ago, Slaughter et al. (1953) reported that "field cancerization" could appear in oral-stratified squamous epithelium cell sites before oral carcinoma development. Today, it is known that "field cancerization" represents sites that contain genetic and epigenetic alterations. "Field cancerization" has been described in gastric mucosa (Maejima et al. 2006), colorectal cancer developed from ulcerative colitis (Issa et al. 2001), Barrett oesophagus (Eads et al. 2000), lung epithelium (Guo et al. 2004), chronic hepatitis (Kondo et al. 2000), kidney disease (Arai et al. 2006) and breast cancer (Yan et al. 2006). It is thought that at least some types of inflammation might lead to alterations in the epigenetic regulation (Ushijima 2007). Therefore, the role of periodontal inflammation in the development of epigenetic abnormalities in oral mucosa must not be discarded.

Acknowledgement

The authors are grateful to Dra. Marisi Aida for collecting the gingival tissue samples.

References

- Abolhasani, M., Wertz, X., Pooya, M., Chaurmet-Riffaud, P., Gais, A. & Schwartz, L. (2008) Hyperosmolarity causes inflammation through the methylation of protein phosphatase 2A. *Inflammation Research* 57, 419–429.
- Aidar, M. & Line, S. P. (2007) A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from oral epithelial cells. *Brazilian Dental Journal* 18, 148–152.
- Arai, E., Kanai, Y., Ushijima, S., Fujimoto, H., Mukai, K. & Hirohashi, S. (2006) Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding non-tumorous renal tissues. *International Journal of Cancer* 119, 288–296.
- Bird, A. P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209–213.
- Blanco, D., Vicent, S., Fragar, M. F., Fernandez-Garcia, I., Peire, J., Lujambio, A., Esteller, M., Ortiz-de-Solorzano, C., Pio, R., Lecanda, P. & Montuenga, L. M. (2007) Molecular analysis of a multistep lung cancer model induced by chronic inflammation reveals epigenetic regulation of p16 and activation of the DNA damage response pathway. *Naplasta* 9, 840–852.
- Brothwell, D. J. (2001) Should the use of smoking cessation products be promoted by dental offices? An evidence-based report. *Journal of the Canadian Dental Association* 67, 149–155.
- Chang, M. S., Uozaki, H., Chong, J. M., Ushiku, T., Sakuma, K., Ishikawa, S., Hino, R., Barua, R. R., Iwasaki, Y., Arai, K., Fujii, H., Nagai, H. & Fukuyama, M. (2006) CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus. *Clinical Cancer Research* 12, 2995–3002.
- Clark, S. J., Harrison, J. & Molloy, P. L. (1997) Sp1 binding is inhibited by (m)CpG(m)CpG methylation. *Gene* 195, 67–71.
- De Luca, J. E., Wertz, B. R., Yee, D., Rickert, B. L. & Pucht, L. T. (2003) Atypical methylation of the interleukin-8 gene correlates strongly with the metastatic potential of breast carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13988–13993.
- Eads, C. A., Lord, R. V., Kurumboor, S. K., Wickramasinghe, K., Skinner, M. L., Long, T. I., Peters, J. H., DeMeester, T. R., Danenberg, K. D., Danenberg, P. V., Laird, P. W. & Skinner, K. A. (2000) Fields of aberrant CpG island hypermethylation in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Cancer Research* 60, 5021–5026.
- Eads, C. A., Lord, R. V., Wickramasinghe, K., Long, T. I., Kurumboor, S. K., Bernstein, L., Peters, J. H., DeMeester, S. R., DeMeester, T. R., Skinner, K. A. & Laird, P. W. (2001) Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Research* 61, 3410–3418.
- Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B. & Herman, J. G. (2001a) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Research* 61, 3225–3229.
- Forata, T., Shuto, T., Shimazaki, S., Ohira, Y., Saito, M. A., Gruenert, D. C. & Kai, H. (2008) DNA demethylation-dependent enhancement of toll-like receptor-2 gene expression in cystic fibrosis epithelial cells involves SP1-activated transcription. *BMC Molecular Biology* 21, 9–39.
- Gamonal, J., Acevedo, A., Bascones, A., Jorge, O. & Silva, A. (2000) Levels of interleukin-1 β , -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *Journal of Periodontology* 71, 1535–1545.
- Gamonal, J., Acevedo, A., Bascones, A., Jorge, O. & Silva, A. (2001) Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 36, 194–203.
- Guo, M., Akiyama, Y., House, M. G., Hooker, C. M., Heath, E., Gabrielson, E., Yang, S. C., Han, Y., Baylin, S. B., Herman, J. G. & Brock, M. V. (2004) Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer. *Clinical Cancer Research* 10, 7917–7924.
- Guo, M., Ren, J., House, M. G., Qi, Y., Brock, M. V. & Herman, J. G. (2006) Accumulation of promoter methylation suggests epigenetic progression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clinical Cancer Research* 12, 4515–4522.
- Gunoy, U. K., Kõnönen, E. & Uitto, V. J. (2008) Stimulation of epithelial cell matrix metalloproteinase (MMP-2, -9, -13) and interleukin-8 secretion by fusobacteria. *Oral Microbiology Immunology* 23, 432–434.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, B. D. & Baylin, S. B. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 9821–9826.
- Ishii, T., Murakami, J., Notohara, K., Cullings, H. M., Sasamoto, H., Kambam, T., Shirakawa, Y., Naomoto, Y., Ouchida, M., Shimizu, K., Tanaka, N., Jass, J. R. & Matsubara, N. (2007) Oesophageal squamous cell carcinoma may develop within a background of accumulating DNA methylation in normal and dysplastic mucosa. *Gut* 56, 13–19.
- Issa, J. P., Ahuja, N., Toyota, M., Brenner, M. P. & Brentnall, T. A. (2001) Acoelated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Research* 61, 3573–3577.
- Kang, G. H., Lee, H. J., Hwang, K. S., Lee, S., Kim, J. H. & Kim, J. S. (2003b) Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *The American Journal of Pathology* 163, 1551–1556.
- Kang, G. H., Lee, S., Kim, J. S. & Jung, H. Y. (2003a) Profile of aberrant CpG island methylation along multistep gastric carcinogenesis. *Laboratory Investigation* 83, 519–526.
- Kato, K., Hara, A., Kuno, T., Mori, H., Yamashita, T., Toida, M. & Shibata, T. (2006) Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 132, 735–743.
- Kikuchi, S., Yamada, D., Fukami, T., Maruyama, T., Ito, A., Asamura, H., Matsuno, Y., Onizuka, M. & Munkami, Y. (2006) Hypermethylation of the TSLC1/IGSF4 promoter is associated with tobacco smoking and a poor prognosis in primary nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 106, 1751–1758.
- Kondo, Y., Kanai, Y., Sakamoto, M., Mizokami, M., Ueda, R. & Hirohashi, S. (2000) 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* 32, 970–979.
- Kulkarni, V. & Samnath, D. (2004) Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncology* 40, 145–153.
- Lee, S., Hwang, K. S., Lee, H. J., Kim, J. S. & Kang, G. H. (2004) Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Laboratory Investigation* 84, 884–893.
- Maekita, T., Nakazawa, K., Mihara, M., Nakajima, T., Yanoaka, K., Iguchi, M., Arai, K., Kaneda, A., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Tamura, G., Saito, D., Sugimura, T., Ichinose, M. & Ushijima, T. (2006) High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clinical Cancer Research* 12, 989–995.
- Marsit, C. J., McClean, M. D., Fumiss, C. S. & Kelsey, K. T. (2006) Epigenetic inactivation of the SFRP genes is associated with drinking, smoking and HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 119, 1761–1766.
- Nile, C. J., Read, R. C., Akil, M., Duff, G. W. & Wilson, A. G. (2008) Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatoid* 58, 2686–2693.
- Offenbacher, S., Barros, S. P. & Beck, J. D. (2008) Rethinking periodontal inflammation. *Journal of Periodontology* 79 (Suppl.), 1577–1584.
- Remick, D. G. (2005) Interleukin-8. *Critical Care Medicine* 33, S466–S467.

- Seymour, G. L., Gemmell, E., Kjeldsen, M., Yamazaki, K., Nakajima, T. & Hara, K. (1996) Cellular immunity and hypersensitivity as components of periodontal destruction. *Oral Diseases* 2, 96–101.
- Shuto, T., Furuta, T., Oba, M., Xu, H., Li, J. D., Cheung, J., Gruenert, D. C., Uehara, A., Suico, M. A., Okiyoda, T. & Kai, H. (2006) Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 20, 782–784.
- Slaughter, D. P., Southwick, H. W. & Smejkal, W. (1953) Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6, 963–968.
- Smith, I. M., Mydlarz, W. K., Mithani, S. K. & Califano, J. A. (2007) DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. *International Journal of Cancer* 121, 1724–1728.
- Soma, T., Kaganai, J., Kawabe, A., Kondo, K., Imamura, M. & Shimada, Y. (2006) Nicotine induces the fragile histidine triad methylation in human esophageal squamous epithelial cells. *International Journal of Cancer* 119, 1023–1027.
- Stenvinkel, P. M., Karim, M., Johansson, S., Axelsson, J., Sullivan, M., Lindholm Heimburger, B. O., Barany, P., Alvestrand, A., Nordfom, L., Qureshi, A. R., Ekström, T. J. & Schalling, M. (2007) Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation – a novel risk factor for cardiovascular disease? *Journal of Internal Medicine* 261, 488–499.
- Takahashi, T., Shigematsu, H., Shivapour, N., Reddy, J., Zheng, Y., Peng, Z., Suzuki, M., Nomura, M., Augustus, M., Yin, J., Meltzer, S. J. & Gazdar, A. F. (2006) Aberrant promoter methylation of multiple genes during multistep pathogenesis of colorectal cancers. *International Journal of Cancer* 118, 934–931.
- Tatemichi, M., Hata, H., Tazawa, H. & Nakadate, T. (2008) Lipopolysaccharide induces aberrant hypermethylation of Hic-1 in mouse embryonic fibroblasts lacking p53 gene. *Anticancer Research* 28, 2101–2108.
- Ting, A. H., McGarvey, K. M. & Baylin, S. (2006) The cancer epigenome – components and functional correlates. *Genes and Development* 20, 3215–3231.
- Tomi, N., Fukuyo, Y., Aikawa, S. & Nakajima, T. (2008) Pro-inflammatory cytokine production from normal human fibroblasts is induced by *Tannerella forsythia* detaching factor. *Journal of Periodontal Research* 43, 136–142.
- Tsai, C. C., Ho, Y. P. & Chen, C. C. (1995) Levels of interleukin-1 β and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *Journal of Periodontology* 66, 852–859.
- Uehara, A., Naito, M., Imamura, T., Potempa, J., Travis, J., Nakayama, K. & Takada, H. (2008) Dual regulation of interleukin-8 production in human oral epithelial cells upon stimulation with gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *Journal Medical Microbiology* 57, 500–507.
- Ushijima, T. (2007) Epigenetic field for cancerization. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 31, 142–150.
- Wade, A. P. (2001) Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *BioEssays* 23, 1131–1137.
- Williams, R. C. (1990) Periodontal disease. *The New England Journal of Medicine* 322, 373–376.
- Yan, P. S., Venkatarama, C., Ibrahim, A., Liu, J. C., Shen, R. Z., Diaz, N. M., Centeno, B., Weber, F., Liu, Y. W., Shapiro, C. L., Eng, C., Yeatman, T. J. & Huang, T. H. (2006) Mapping geographic zones of cancer risk with epigenetic biomarkers in normal breast tissue. *Clinical Cancer Research* 12, 6626–6636.
- Yucel-Lindberg, T. & Brunius, G. (2006) Epidermal growth factor synergistically enhances interleukin-8 production in human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 β . *Archives of Oral Biology* 51, 892–898.

Address:

Ana Paula de Souza
Laboratory of Molecular Biology
Department of Morphology
Division of Histology
School of Dentistry of Piracicaba
University of Campinas
Av. Limeira 901
CEP 13414-018
Piracicaba
SP
Brazil
E-mail: anapaulasouza@fop.unicamp.br

Clinical Relevance

Scientific rationale of for the study: The diagnosis and prognosis of periodontal inflammation are closely linked to a combination of associated factors that create the clinical phenotype. The biology architecture of this phenotype includes inflammatory and immunologic responses against a microbial composition of biofilms that are orchestrated by individual genetic and epigenetic compositions. Alterations in the DNA methylation status represent an epigenetic event that may modify the genetic transcription drastically. Several authors have reported an aberrant methylation status in genes associated with

cancer and there is increasing evidence that DNA methylation is critical for regulating the inflammatory response in a dynamic manner. We have investigated the methylation status in several candidate genes implicated in the host response to oral microbial infection and/or involvement in the destruction of periodontal tissues during inflammation. In the present study, we present the results found in the IL8 gene promoter in samples of non-smoker healthy subjects and smokers and non-smoker subjects with chronic periodontitis.

Principal findings: Our results showed that the IL8 gene promoter

shows a decrease in the methylation status in CpG sites in epithelial cells of the oral mucosa of individuals with chronic periodontitis, independent of smoking habit. The same was not observed in gingival cells and blood cells.

Practical implications: These results show for the first time epigenetic changes in oral cells affected by chronic periodontitis and this may provide new insights into the role of inflammation in oral biology. It may help to understand the molecular events that are occurring in the oral cells and may aid the development of new methods of diagnosis and treatment in the future.