UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA

**EFEITO DO TABAGISMO NO PERFIL DE METILAÇÃO DE DNA NO
PROMOTOR DO GENE SOCS-1 EM CÉLULAS EPITELIAIS DA
MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE
PERIODONTITE CRÔNICA (FUMANTES E NÃO FUMANTES)**

CRISTHIAM DE JESÚS HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

PG.PERIO
FORP-USP

Ribeirão Preto

2018

CRISTHIAM DE JESÚS HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

Efeito do tabagismo no perfil de metilação de DNA no promotor do gene *SOCS-1* em células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos portadores de periodontite crônica (fumantes e não fumantes)

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em ciências.

Área de Concentração: Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Junior.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos.

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação na Publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Martínez, Cristhiam de Jesús Hernández

Efeito do tabagismo no perfil de metilação de DNA no promotor do gene *SOCS-1* em células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos portadores de periodontite crônica (fumantes e não fumantes)

Ribeirão Preto, 2018.

124p.:il.;30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Junior.

Versão corrigida da dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Periodontia. A versão original encontra-se disponível na unidade que aloja o programa.

1.Metilação de DNA. 2.Periodontite crônica. 3.Fumantes. 4.Epigenética.

5. Supressor da sinalização de citocinas (*SOCS-1*).

Cristhiam de Jesús Hernández Martínez

Efeito do tabagismo no perfil de metilação de DNA no promotor do gene SOCS-1 em células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos portadores de periodontite crônica (fumantes e não fumantes).

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de mestre em Periodontia.

Área de Concentração: Periodontia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr: Arthur Belém Novaes Jr. (Orientador)

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Ao criador de tudo quanto existe. Ele que me tem dado a fortaleza para continuar quando tenho estado ao ponto de cair; por ter me dado a vida e permitir-me ter chegado até este momento tão importante da minha formação profissional; por fortalecer meu coração e iluminar minha mente e por ter posto no meu caminhar aquelas pessoas que tem sido o meu suporte e companhia durante estes dois anos. Por isso, com toda a humildade que do meu coração possa emanar, dedico essa tese a DEUS.

“A fé em Deus nos faz crer no incrível, ver o invisível e realizar o impossível” (João 8,32).

A toda minha família, a qual tem me brindado seu apoio incondicional e compartilhado comigo bons e maus momentos, especialmente aos meus pais, Rosa e Cristóbal, por serem as pessoas que têm me acompanhado durante toda minha caminhada de vida pessoal e profissional, pois eles souberam formar-me com bons sentimentos, hábitos e valores, os quais têm me ajudado a encarar os momentos mais difíceis.

A meu tio Humberto, pelo apoio incondicional, por ser esse exemplo de superação e dedicação.

Como não lembrar das duas pessoas que acreditaram em mim, antes de mim mesmo, tia Cláudia e Fátima (*Em memória*), foi uma grande dor perde-las, pois não há adeus mais difícil do que aquele que sabemos que é para sempre, sua partida quebrou meu coração, mas nossas lembranças me confortam e, nas horas de maior dor, secam as minhas lágrimas. “Saudade tem rosto, nome e sobrenome. Saudade tem cheiro, tem gosto. Saudade é a vontade que não passa. É a ausência que

incomoda. Saudade é a prova de que tudo valeu a pena...” Lu Oliveira. As levo no meu coração. Isto também é de vocês.

Aos amigos (as), professores (as) e todos aqueles (as) que cruzaram em minha vida, participando, de alguma forma, na construção e realização deste tão desejado sonho.

Agradecimento Especial

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos professores de Periodontia da FORP-USP: Arthur Belém Novaes Junior, Sergio Luís Scombatti de Souza, Daniela Bazan Palioto, Mario Taba Junior e Michel Reis Messori. Quero agradecer por estes dois anos de aprendizado, sinto a necessidade de transmitir-lhes minha profunda admiração, que gera em mim a vocação pelo ensino. Devo a essa equipe a construção do meu currículo. Tive grande oportunidade de ter trabalhado com todos. Obrigado aos senhores pela sua dedicação, ajuda, por cada aporte e por me fazerem sentir que meus sonhos e metas as posso cumprir, transitando um caminho que posso desfrutar.

À Profa. Dra. Esther Silveira Ramos da FMRP, pela dedicação, confiança, paciência, oportunidade de trabalhar em seu grupo, e pela orientação no desenvolvimento dessa dissertação.

À Juliana Oliveira, Heloise Ranucci, Grace Ruiz, Kelly Rocio V, Mariana Sales vocês foram e são uma parte essencial, agradeço a todas as conquistas que alcançamos juntos, por todas as dificuldades que conseguimos superar, trabalhar assim, ao lado de pessoas tão maravilhosas, companheiras, generosas e amigas, é um grande privilégio.

À Eloir Walter e Ronaldo Martins pelo apoio incondicional.

Há pessoas que marcam a nossa vida, que despertam algo especial, que abrem nossos olhos de modo irreversível e transformam à nossa maneira de ver o mundo.

À vocês, toda a minha gratidão e carinho!

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

À CNPq, pelo suporte financeiro nestes dois anos de estudos.

À Profa. Dra. Ana Carolina Fragoso Motta, por estar disponível a ajudar, ensinar e orientar, independente do seu envolvimento com a pesquisa.

A Reginaldo, técnico do laboratório de Genética na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo apoio que me foi dado, prontificando-se sempre a nos ajudar.

A Hugo Rego e Jorge Petrolí, pelo apoio prestado durante o desenvolvimento laboratorial.

À Dulce, Dani Lima e Isabel Gobbo, pelo profissionalismo, atenção e amizade ao longo desses dois anos de convivência. Muito obrigado.

À Daniela Steter, por ter me ensinado com sua paciência e carinho, de maneira competente, durante os atendimentos clínicos e preenchimento de documentações na clínica de Pós-graduação.

À Joana Darc Leandro, Renata Fernandes, pelo apoio que sempre me foi dado na recepção dos meus pacientes, na árdua tarefa de agendar os pacientes das disciplinas de estudo e desta pesquisa.

À Renata Cardoso, Pedro Felix, Atila Nobre, que estiveram comigo. A nossa história é tão longa que é difícil resumir em poucas palavras tudo o que passou e tudo o que ficou. Meus irmãos Brasileiros, tenho certeza que vocês chegarão longe. Muito sucesso!

Ao meu parceiro, Kleber Tanaka, por sempre ter a disposição para me ensinar, ajudar e orientar durante os procedimentos cirúrgicos. Foi uma grande escola ter

compartilhado conhecimentos e prática clínica. Com certeza, você será um grande professor.

Aos meus colegas e amigos de mestrado, Marília Reis, Yasmin Dal Acqua, Uislem Cadore, pela ajuda que me concederam nesses últimos anos. Agradeço pelo carinho. Sucesso a todos!

Aos colegas de doutorado, Sérgio Lagos, Katharina Tahin, Luiz Fernando, Barbara Masalskas, pelo prazer do convívio agradável que tivemos durante as atividades clínicas.

A todos os funcionários da FORP, muito obrigado.

Epígrafe

“Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica esta informação”.

Carl Sagan

Resumo

RESUMO

Martínez, Cristhiam de Jesús Hernández. **Efeito do tabagismo no perfil de metilação de DNA no promotor do gene SOCS -1 em células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos portadores de periodontite crônica (fumantes e não fumantes)**. 2018. 102f. Dissertação de Mestrado em Periodontia. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A periodontite está relacionada à genética do hospedeiro, constituição do biofilme dental e fatores ambientais como o hábito de fumar. A metilação do DNA é um mecanismo de expressão genética que pode inibir ou silenciar a expressão do gene. Desta forma, vários pesquisadores têm se dedicado a estudar a influência genética sobre a suscetibilidade e/ou risco aumentado à doença periodontal. Estudos têm relatado associação entre vários biomarcadores epigenéticos com a inflamação periodontal. Considerando a hipótese de que existe associação do tabagismo com a metilação em genes relacionados à doença periodontal, o objetivo deste estudo foi verificar o padrão de metilação do DNA em células do epitélio oral de pacientes com periodontite crônica (CP) no promotor de um gene específico envolvido no controle da inflamação, como supressor da sinalização de citocinas (SOCS-1) em pacientes fumantes e não fumantes. O gene SOCS-1 é localizado no cromossomo 16p13.3, compostos por uma região amino-terminal, um domínio SH2 central e uma caixa SOCS. É um regulador negativo da *via JAK / STAT*. Inibe os efeitos biológicos de várias citocinas, incluindo *IL-2*, *IL-3*, *IL-4*, *IL-6*, *interferão (INF) - γ* e *INF- α / β* . Este foi um estudo caso-controle, comparando dois grupos, um grupo (teste) com consumo de 10 cigarros mínimos por dia, com diagnóstico de periodontite crônica e outro grupo controle que foram pacientes não fumantes com periodontite crônica. Para tal, DNA

genômico foi purificado de células epiteliais bucais obtidas por meio de enxágue com sacarose 3%, por tempo único de coleta. O DNA foi modificado pelo bissulfito de Sódio e os padrões de metilação do DNA foram analisados com a técnica MS-PCR (Polymerase chain reaction). A análise estatística foi realizada pela plataforma estatística R version 3.3.2 Core Team (2016). Foi realizado Teste t de Student para amostras independentes e teste não paramétrico de Wilcoxon & Mann-Whitney para variáveis qualitativas; teste qui-quadrado e para a variável metilação, foi feito um teste exato de Fisher para testar a associação entre os grupos e a metilação. Os resultados indicaram que, para células epiteliais da mucosa bucal, a frequência de desmetilação no gene *SOCS-1* é maior no grupo sem o hábito do fumo, em comparação ao grupo fumante. Foram detectadas diferenças no padrão de metilação entre os dois grupos. Ao estabelecer uma estimativa de risco relativo entre os grupos e a variável metilação, foi observado que pacientes fumantes têm 7,08 vezes (risco relativo) com um intervalo (1,95-51.46) de apresentar doença periodontal crônica, com um padrão de metilação no gene *SOCS-1*.

Palavras-chave: Metilação de DNA. Periodontite crônica. Fumantes. Epigenética. Supressor da sinalização de citocinas (*SOCS-1*).

Abstract

ABSTRACT

Martínez, C.J.H. **Effect of smoking on the DNA methylation profile of the SOCS-1 gene promoter in oral mucosal epithelial cells of individuals with chronic periodontitis (smokers and nonsmokers).** 2018. 102p. Master Thesis in Periodontics. Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto. University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Periodontitis is related to host genetics, constitution of the dental biofilm and environmental factors such as smoking. DNA methylation is a mechanism of genetic expression that can inhibit or silence gene expression. In this way several researchers have been dedicated to study the genetic influence on the susceptibility and / or increased risk to periodontal disease. Studies have reported association between several epigenetic biomarkers with periodontal inflammation. Considering the hypothesis that there is an association between smoking and methylation in genes related to periodontal disease, the objective of this study was to verify the DNA methylation pattern in oral epithelial cells of patients with chronic periodontitis (ChP) in the promoter of a specific gene involved in the control of inflammation, as suppressor of cytokine signaling (SOCS-1) in smokers and nonsmokers patients. The SOCS-1 gene is located on chromosome 16p13.3 composed of an amino-terminal region, a central SH2 domain and a SOCS box. It is a negative regulator of the JAK / STAT path. It inhibits the biological effects of various cytokines, including *IL-2*, *IL-3*, *IL-4*, *IL-6*, *interferon (INF) - γ* and *INF- α / β* . This was an case-control type study, comparing two groups, a group with consumption of 10 minimum cigarettes per day, with a diagnosis of chronic periodontitis and another control group were non-smokers with chronic periodontitis. For this, genomic DNA was purified from oral epithelial

cells obtained by rinsing with 3% sucrose, for a single time of collection. The DNA was modified by Sodium bisulfite and the methylation patterns of the DNA were analyzed with the MS-PCR technique (Polymerase chain reaction). Statistical analysis was performed by the statistical platform R version 3.3.2 Core Team (2016), Student's t-test was performed for independent samples and Wilcoxon's & Mann-Whitney non-parametric test for qualitative variables; chi-square test. For the methylation variable, an exact Fisher's test was performed to test the association between the groups and the methylation. The results indicated that, for oral mucosal epithelial cells, the frequency of demethylation in the *SOCS-1* gene is higher in the non-smoking group as compared to the smoker group. statistically significant differences were detected in the methylation pattern between the two groups. When establishing an relative risk between the groups and the methylation variable, it was observed that smokers are 7.08 times (relative risk) of having chronic periodontal disease with a methylation pattern in the *SOCS-1* gene.

Keywords: DNA Methylation. Chronic Periodontitis. Smoking. Epigenetics. Suppressor of cytokine signaling (*SOCS-1*).

Lista de Símbolos e Siglas

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

%	porcentagem
µg	micrograma
µL	microlitro
5-Mc	5-metilcitocinas
A	Adenina
C	Citocina
C.	<i>Pneumoniae</i> - Chlamydophila pneumoniae
C.	<i>Rectus</i> - Camphylobacter rectus
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COL1A1	Colágeno 1 alfa 1
CP	Periodontite Crônica
CpG	C-Phosphate-G
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DNA MTase	DNA metiltransferase
DNMT 1	DNA metiltransferase 1
DNMT 2	DNA metiltransferase 2
DNMT 3	DNA metiltransferase 3
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacetico
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
G	guanina
GEC _s	células epiteliais gengival
IL-1	<i>Interleukin 1</i>
IL-2	<i>Interleukin 2</i>
IL-3	<i>Interleukin 3</i>
IL-4	<i>Interleukin 4</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IL-10	<i>Interleukin 10</i>
INF γ	<i>Interferon gamma</i>
INF α/β	<i>Interferon alfa e beta</i>
JAK-STAT	Via de sinalização Janus Kinasa e atuação transcricional

KCl	Cloreto de potássio
Kg	quilograma
KH_2PO_4	Fosfato monopotássico
LPS	lipopolisacarídeos
M	molar
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
MMP_s	Metaloproteinase da matriz
MSP	Methylation-specific (metilação específica)
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
Ng	nanogramas
°C	Graus Celsius
<i>P. Gengivalis</i>	<i>Porphyromonas gengivalis</i>
Pb	pares de base
PBMC _s	células mononucleares de sangue periférico
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da
polymerase)	
pH	potencial hidrogeniônico
PF	Paciente Fumante
PNF	Paciente não Fumante
Rpm	rotações por minuto
SOCS-1	<i>Suppressor of cytokine signalin 1</i> (Supressor de citocinas)
T	timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	Linfócitos T1
tRNA	Transfer RNA (transportador RNA)
U	uracila
USP	Universidade de São Paulo
AgP	Periodontitis agressiva
PF	Paciente Fumante

PNF

Paciente não Fumante

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização e localização da sequência dos Primers dentro do fragmento de interesse na região do cromossomo GRCh38:16:11253655:11256929.
.....72

Tabela 2 – Frequencia de metilação do promotor *SOCS-1* em pacientes com periodontite crônica fumantes (ChP/S) e não fumantes (ChP).....77

Tabela 3 – Dados sociodemográficos e clínicos de pacientes com periodontite crônica em relação ao status de fumante ou padrão de metilação.....78

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Patogenia da doença periodontal.....	36
Figura 2- Metilação do DNA e inativação transcricional do gene.	40
Figura 3- A metilação do DNA pode ocorrer em diferentes regiões do genoma. A alteração desses padrões leva à doença nas células. O cenário normal é representado na coluna da esquerda e as alterações desse padrão são mostradas à direita. (a) As ilhas CpG nos promotores de genes são normalmente não metiladas, permitindo a transcrição. A hipermetilação aberrante leva à inativação transcricional. b) O mesmo padrão é observado ao estudar ilha cortas, que estão localizadas até 2 kb por cima ou por baixo da ilha CpG. (c) No entanto, quando a metilação ocorre no corpo do gene, facilita a transcrição, evitando iniciações de transcrição. Na doença, o corpo do gene tende a desmetilar, permitindo que a transcrição seja iniciada em vários locais incorretos. (d) Finalmente, as sequências repetitivas parecem ser hipermetiladas, prevenindo instabilidade cromossômica, translocações e ruptura de genes através da reativação de sequências endoparasíticas. Este padrão também é alterado na doença.....	41
Figura 4 - Estrutura Estrutura das proteínas SOCS-1. Todos os oitos membros da família de proteínas SOCS contém uma região N-terminal de comprimento e sequencia variável, um domínio SH2 central e uma caixa SOCS-C terminal.	51

Figura 5 - Função das proteínas SOCS-1. As proteínas SOCS atuam em um loop de feedback negativo para atenuar a sinalização. Após ligação a seu receptor, as citocinas ativam a via JAK/STAT, resultando em um aumento na transcrição não só dos genes que medeiam o efeito biológico da citocina, mas também os genes SOCS. Uma vez produzidas, as proteínas SOCS podem inibir a sinalização por ligação a JAKs e receptores fosforilados e podem interagir com componentes de E3 ubiquitin ligases para JAK de poliubiquidação e direciona-los para a degradação proteasomal.....53

Figura 6 - Os mecanismos de ação de SOCS em células inflamatórias e precursores de osteoclastos.55

Figura 7 - Esquematização da seleção final da amostra.....66

Figura 8 - Esquematização do procedimento de conversão com Kit de conversão EZ DNA Methylation – Gold™ Kit da ZYMO RESEARCH. Modificado do protocolo do fabricante.....69

Figura - 9A) Representação esquemática do amplicon de 184 pb do fragmento de interesse do gene SOCS-1 a sequência de primers metilado está representado por letras vermelhas.71

Figura - 9B) Representação esquemática do amplicon de 183 pb do fragmento de interesse do gene SOCS-1 a sequência de primers não metilado está representado por letras verde..71

Figura 10 - A frequência de metilação no promotor do gene *SOCS-1* para células epiteliais da mucosa bucal de pacientes não fumantes e fumantes com periodontite crônica. (B) Fragmentos do gene *SOCS-1* com 184pb para metilado e fragmentos do gene *SOCS-1* com 183pb para não metilado derivados de células epiteliais da mucosa bucal NF = pacientes não fumantes (n=21); F= pacientes fumantes (n=24); M= metilado; U= não metilado.....76

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	35
1.1	Epigenética.....	36
1.2	Metilação do DNA	38
1.3	O caminho epigenético perio-sistêmico.....	41
1.4	O papel da epigenética na doença periodontal	42
1.5	Fatores que modificam os mecanismos epigenéticos e a doença periodontal	44
1.6	Fumo e doença periodontal.....	46
1.7	Gene SOCS-1	49
1.8	Mecanismos de ação do SOCS-1 em células inflamatórias e precursores de osteoclastos	54
2	JUSTIFICATIVA.....	57
3	HIPÓTESES.....	61
3.1	PROPOSIÇÃO	61
4	MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1	Aspectos éticos do projeto	63
4.2	Casuística.....	63
4.3	Parâmetros Clínicos Periodontais	64
4.4	Coleta das amostras	65
4.5	Análise Molecular	66
4.5.1	Extração do DNA genômico	66
4.5.2	Conversão do DNA pelo Bissulfito de sódio	68
4.5.3	Escolha dos <i>Primers</i>	69
4.6	Ensaio qualitativo.....	72
4.7	Análise de metilação do DNA.....	72

4.7.1	PCR metilação específica (MS-PCR).....	72
4.8	Análises estatísticas	73
5	RESULTADOS.....	76
6	DISCUSSÃO	80
7	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS.....	89
	APÊNDICE A	113
	APÊNDICE B	115
	ANEXO A	117
	ANEXO B	120
	ANEXO C	122
	ANEXO D	123
	ANEXO E	124

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As doenças periodontais compreendem uma ampla gama de condições inflamatórias que afetam as estruturas de apoio dos dentes (gengiva, osso e ligamento periodontal), o que poderia levar à perda de dentes e contribuir para a inflamação sistêmica. A periodontite crônica afeta predominantemente adultos, mas a periodontite agressiva pode ocasionalmente ocorrer em crianças. O início da doença periodontal e a sua propagação é através de uma disbiose da microbiota comensal oral (biofilme), que então interage com as defesas imunes do hospedeiro, levando à inflamação e, conseqüentemente, à doença. A gravidade da doença periodontal depende dos fatores de riscos ambientais, como fazer uso de fumo e genéticos (KINANE et al., 2017) (Figura 1).

Com a conclusão do projeto do Genoma Humano em 2003, o estabelecimento das relações casuais entre genes específicos e doenças complexas mostrou-se desafiador para identificar como a variação na expressão gênica influencia o desenvolvimento da doença (WILLIAMS et al., 2014). Muitos estudos relataram que as reações inflamatórias na polpa infectada e no tecido periodontal afetam as modificações epigenéticas causando as alterações na expressão gênica (SEO et al., 2014). Recentemente, foram relatadas alterações de biomarcadores epigenéticos, como citocinas inflamatórias envolvidas na periodontite (SEO et al., 2014).

1.1 Epigenética

No genoma humano, a expressão de um subconjunto de aproximadamente 30.000 genes que são ativos em diferentes órgãos e tecidos, é resultado da regulação por mecanismos epigenéticos que atuam na ativação ou inativação de genes ou regiões gênicas, sem haver, necessariamente, alterações na sequência do DNA (REIK, 2007).

Figura 1- Patogenia da doença periodontal.

Fonte: Kinane et al. (2017, p.11).

O termo epigenética foi utilizado pela primeira vez por Conrad Waddington (1942) em um estudo de desenvolvimento embrionário. Segundo esse pesquisador, o curso do desenvolvimento é determinado pela interação dos genes entre si e com o ambiente. Holidayy aplicou o termo epigenética, em 1987, para situações em que mudanças na metilação do DNA resultavam em alterações na função gênica.

Russo, Martuenssen e Riggs (1996) sugeriram que epigenética seria o estudo das alterações herdáveis mitótica e/ou meioticamente na função gênica que não podem ser explicadas por mudanças na sequência do DNA. Porém, sobre esta definição, Bird (2007) discutiu o aspecto restritivo desta visão de herdável e redefiniu epigenética como sendo “a adaptação estrutural de regiões cromossômicas para registrar, sinalizar ou perpetuar estados de atividade”. Esta definição está focada, não somente no gene, mas também nos cromossomos sem considerar, no entanto, o conceito de herdabilidade. Em nível molecular, modificações covalentes de bases citocinas e em histonas, e mudanças no posicionamento de nucleossomos são geralmente consideradas como os principais mecanismos epigenéticos. Esses mecanismos são fundamentais para os processos celulares de expressão gênica, embriogênese, inativação do cromossomo X e *imprinting* (marcação) genômico (PORTELA; ESTELLER, 2010).

Tendo em conta estas diferentes perspectivas, foi proposta uma definição de trabalho aceitável da epigenética que possa ser: um grupo de mecanismos moleculares dinâmicos adquiridos ou herdados e potencialmente transgeracionais, que são afetados pelo meio ambiente e que atuam diretamente sobre o genoma e a maquinaria genética ao longo da vida para regularizar a expressão gênica (WILLIANS et al., 2014).

O epigenoma compreende o conjunto das modificações epigenéticas que é caracterizada para cada tipo celular. As marcas epigenéticas fornecem mecanismos à diferenciação, por meio da regulação da acessibilidade da informação genética para a maquinaria celular, além de promover o silenciamento de elementos repetitivos, inibindo sua replicação e transposição dentro do genoma (SHARMA et al., 2010). Estas modificações incluem quatro mecanismos principais: metilação do DNA,

modificação de histonas, proteínas de cromatina não-histônicas que se ligam diretamente ao DNA, ou aos modificadores de histonas e RNAs não codificadores (PROBST; DUNLEAVY; ALMOUZNI, 2009).

A cromatina é um complexo multimolecular formado pelo DNA genômico compactado no núcleo, associado com proteínas histonas. A unidade fundamental da cromatina é o nucleossomo, que consiste de um cerne formado por um octamero de histonas (duas cópias de cada: H2A, H2B, H3 e H4) envolvido por cerca de 146 pares de base de DNA (LUGGER et al., 1997). O quinto tipo de histonas H1 atua como um grampo ao redor do octamero que associado aos nucleossomos são chamados de cromatosomas (BENJAMIN, 2003). Essas modificações alteram a estrutura da cromatina pela adição de grupos químicos às caudas dessas proteínas histonas que formam o nucleossomo. Essas modificações podem ser do tipo fosforilação, ubiquitinação e acetilação em histonas e, principalmente a metilação no DNA sendo que essas últimas ocorrem geralmente próximas às regiões promotoras (REIK et al., 2003; WANG; SCHONES; ZHAO, 2009). Mais recentemente, a atuação de RNAs não codificadores (ncRNAs) tem sido incluída dentre os mecanismos epigenéticos, ativando ou silenciando genes em um determinado domínio cromossômico (como os longos ncRNAs KCNQ1OT1 e AIR) ou pela modulação da estrutura da cromatina como o ncRNA XIST (MOHAMMAD, MONDAL; KADURI, 2009).

1.2 Metilação do DNA

Até o momento, a metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais bem caracterizado e estudado por sua grande influência na regulação gênica, sendo um dos principais envolvidos na alteração da estrutura tridimensional da molécula de DNA (WAGGONER, 2007).

A metilação do DNA em eucariotos está relacionada à regulação gênica, inativação do cromossomo X, memória celular, silenciamento de elementos transponíveis, imprinting genômico e repressão de pseudo-elementos provenientes de sequências duplicadas (FEIL; FRAGA, 2012; JONES, 2012).

A metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil a citocinas precedidas por guaninas (em procariotos também em adeninas) realizada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNA MTase), a qual inclui uma família classificada em três grupos de enzimas do tipo metiltransferases: DNMT1, DNMT2 (ou TRDMT1) e DNMT3. A DNMT1 é predominante e responsável pela restauração dos sítios hemimetilados que ocorrem durante a replicação do DNA, copiando o padrão de metilação da fita original, processo geralmente conhecido como metilação de manutenção (HERMAN; BAYLIN, 2003). A DNMT2, diferentemente das demais metiltransferases, apresenta uma atividade metiltransferase de tRNA (BESTOR, 2000). DNMT3a e DNMT3b estão relacionadas à aquisição de novos sítios metilados (DNA não-metilado previamente). Enquanto isso, DNMT3L, apesar de não possuir atividade de metiltransferase, parece ter um importante papel regulatório na metilação do DNA (OKANO et al., 1999; BOUR'CHIS et al., 2001). Em mamíferos, os padrões de metilação são estabelecidos, mantidos e traduzidos em estados funcionais apropriados da maquinaria de metilação do DNA principalmente por essa família de enzimas e suas isoformas (DNMT1b, DNMT1o, DNMT3a, DNMT3b, DNMT 3L) (GOLL et al., 2006; XIE et al., 2009) (Figura 2 e 3).

Figura 2- Metilação do DNA e inativação transcricional do gene.

Fonte: Ari et al., (2016, p.8).

A metilação do DNA é mais frequente nas regiões denominadas ilhas CpG (regiões com alta frequência de repetições CG), onde o nucleotídeo citosina (C) aparece ao lado de um nucleotídeo guanina (G) na sequência linear ao longo das bases. CpG é o acrônimo para C-phosphate (fosfato) -G, que é a citosina e a guanina separadas apenas pelo fosfato que liga os dois nucleotídeos ao longo do DNA. Em mamíferos, 70% a 80% das repetições CpG possuem citosinas metiladas, e a definição atual de ilha CpG é uma região com no mínimo 200 pares de bases e que possua porcentagem de CG acima de 60%. É importante considerar que o genoma humano possui 42% de citosinas e guaninas e taxa esperada de repetições CpG na ordem de 4,41% (SAXONOV et al., 2006; BAJIC et al., 2004; JABBARI; BERNARDI, 2004).

Figura 3- A metilação do DNA pode ocorrer em diferentes regiões do genoma. A alteração desses padrões leva à doença nas células. O cenário normal é representado na coluna da esquerda e as alterações desse padrão são mostradas à direita. (a). As ilhas CpG nos promotores de genes são normalmente não metiladas, permitindo a transcrição. A hipermetilação aberrante leva à inativação transcricional. b) O mesmo padrão é observado ao estudar ilha curtas, que estão localizadas até 2 kb por cima ou por baixo da ilha CpG. (c). No entanto, quando a metilação ocorre no

corpo do gene, facilita a transcrição, evitando iniciações de transcrição. Na doença, o corpo do gene tende a desmetilar, permitindo que a transcrição seja iniciada em vários locais incorretos. (d). Finalmente, as sequências repetitivas parecem ser hipermetiladas, prevenindo instabilidade cromossômica, translocações e ruptura de genes através da reativação de sequências endoparasíticas. Este padrão também é alterado na doença.

Fonte: Portela; Esteller., (2010, p.1058)

1.3 O caminho epigenético perio-sistêmico

A periodontite não é meramente uma lesão localizada na gengiva, sua cronicidade permite causar impacto sistêmico significativo na saúde, como ponte para outras doenças como: aterosclerose, diabetes, desfechos de gravidez adversos, artrite reumatóide, etc (GROVER et al., 2014).

Angrisano et al., (2011) investigaram o papel dos mecanismos epigenéticos na ativação do gene *IL-8* induzida por LPS em células epiteliais intestinais humanas. Uma associação clara foi encontrada entre infecção bacteriana da mucosa e

alterações epigenéticas associadas ao risco aumentado de câncer gástrico. Diabetes e aterosclerose são outras doenças às quais a modulação epigenética foi associada. O uso do cigarro é um fator bem documentado responsável pela hipometilação global e está associado ao desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço de células escamosas (GROVER et al., 2014).

Imai; Okamoto (2006) elucidaram que, em pacientes com infecção latente por hiv-1, a infecção *P.gingivalis* causou a indução da expressão gênica e ativação do vírus. Os autores identificaram *P.gingivalis* como um fator de risco para a progressão da AIDS. Um maior grau de metilação do DNA foi encontrado associado a doenças inflamatórias crônicas, como gastrite crônica e colite ulcerativa, bem como em câncer de próstata. *IL-6* é considerado um importante mediador que previne doenças inflamatórias crônicas. DNA metiltransferase (DNMT1) mantém o padrão de metilação, quando o nível de *IL-6* é baixo. Porém a falta de regulação no promotor p53, podem desempenhar um papel fundamental na iniciação do câncer (GROVER et al., 2014).

1.4 O papel da epigenética na doença periodontal

Pesquisas mais recentes estão demonstrando que o sistema imunológico e as respostas inflamatórias são altamente dependentes de mecanismos epigenéticos para funcionar. Isso tem implicações para todas as doenças inflamatórias, incluindo a periodontite (WILLIAMS et al., 2014).

Em geral, existem citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias. O equilíbrio dessas citocinas que determina qual resposta do sistema imunológico é desencadeada diante de estímulos ambientais específicos. No caso da periodontite em um hospedeiro susceptível, toxinas e produtos de degradação de bactérias e

células imunes resultam em uma predisposição significativa para uma resposta de citocinas pró-inflamatória a esses estímulos, causará o desenvolvimento de uma resposta hiperinflamatória com colapso periodontal concomitante. Atualmente, é evidenciado que mudanças epigenéticas em genes que codificam citocinas podem alterar sua expressão, levando a respostas pró ou anti-inflamatórias (WILLIAMS et al., 2014).

Estudos têm demonstrado que as alterações epigenéticas dos genes que codificam as citocinas pró-inflamatórias estão associadas à periodontite (ZHANG et al., 2013). Outros estudos demonstraram associação entre alterações epigenéticas do tipo polimorfismo e periodontite (ZHANG et al., 2010). A maioria dos estudos publicados tem como foco a periodontite crônica, mas uma correlação também foi estabelecida entre a metilação do DNA de genes mediadores pró-inflamatórios e periodontite agressiva (ANDIA et al., 2010-2015).

Gomez & colaboradores (2009) enfatizaram que o padrão de metilação causado por mudanças na expressão do gene da citocina pode levar a doenças inflamatórias. As citocinas inflamatórias, como *IL1*, *IL4*, *IL6* e *IL10*, estão sendo sobre expressadas no sistema periodontal inflamado (KINANE et al., 2003). Stenvinkel et al. (2007) sugeriram que uma inflamação persistente leva à metilação do DNA, silenciando os supressores da sinalização das citocinas e induzindo a expressão ativa de sinalizadores das citocinas. As citocinas, como a *IL6* e *IFN γ* , foram sobre expressas em tecidos inflamados de pacientes com periodontite crônica (SEO et al., 2015). Além disso, a superexpressão da *IL-6* pode exercer uma influência epigenética nas células, regulando o gene *DNMT* ou mantendo o seu estado de metilação, conforme demonstrado anteriormente em estudos in vitro (STENVINKEL et al., 2007).

Para Zhang et al. (2010) a hipometilação do promotor do gene *IFN γ* pode levar a uma maior transcrição deste na periodontite crônica, resultando assim na sua superexpressão. Os mesmos autores ainda revelaram que a mudança no perfil de metilação pode ser um fator crucial na regulação da transcrição do gene *TNFa* na periodontite. Além disso, verificou-se que a inflamação crônica está relacionada a níveis alterados de metilação do DNA e pode levar a uma diminuição da expressão do gene *COX-2* (ZHANG et al., 2010- 2013).

A evidência também sugere que a presença de inflamação crônica e infecção bacteriana promove a metilação do DNA. Neste contexto, o potencial de bactérias orais para alterar os padrões de metilação do DNA na mucosa está atualmente em investigação. No entanto, não se sabe se ocorrem mecanismos epigenéticos devido à interação bacteriana direta com o tecido ou como consequência de uma resposta inflamatória do hospedeiro (GOMEZ; DUTRA; MOREIRA, 2009). Tomados em conjunto, a identificação de fatores genéticos e fatores epigenéticos poderia ser valiosa para o desenvolvimento de tratamentos orais e prevenção de doenças (SEO et al., 2015).

1.5 Fatores que modificam os mecanismos epigenético e a doença periodontal

A susceptibilidade à periodontite e outras doenças inflamatórias parece mudar em resposta a interações complexas de fatores genéticos, ambientais e estocásticos ao longo da vida. Muitos fatores de risco modificáveis, como depressão e tabagismo, contribuem para o aumento dos marcadores sistêmicos de inflamação e modificam a regulação de genes através de uma variedade de mecanismos biológicos (por exemplo, modificações epigenéticas). Portanto, a periodontite e outras doenças

inflamatórias compartilham muitos fatores de risco modificáveis comuns, como o tabagismo, estresse e depressão psicológica, consumo de álcool, obesidade, diabetes, síndrome metabólica e osteoporose (REYNOLDS, 2014). O tabagismo e diabetes são os únicos fatores de risco conhecidos para esta doença, aumentando a extensão e gravidade da periodontite em 3-10 vezes e acelerando a destruição periodontal de forma exponencial (GANESAN et al., 2017).

Uma combinação de estressores fisiológicos e exposições ambientais durante a vida de um organismo parece afetar o "programa" epigenômico adquirido por uma célula durante a diferenciação e ao longo da vida da linhagem celular. O programa epigenômico pode ser particularmente sensível às influências ambientais durante os primeiros estágios de desenvolvimento, mas mudanças significativas induzidas pelo meio ambiente podem se acumular ao longo da vida de um organismo, criando o "fenótipo do envelhecimento" e aumentando o risco de doenças associadas ao envelhecimento (BARROS; OFFENBACHER, 2014).

Um estudo com gêmeos monozigóticos mostrou que os padrões de metilação do DNA eram muito semelhantes em gêmeos jovens, mas em gêmeos mais velhos os padrões foram alterados. Esses dados sugerem que os fatores ambientais presentes no estilo de vida de cada indivíduo induzem a ocorrência de eventos epigenéticos que possam influenciar a saúde do indivíduo (GOMEZ; DUTRA; MOREIRA, 2009).

Embora o envelhecimento e as exposições ambientais possam afetar a metilação global do genoma, novas evidências indicam que alguns pontos de metilação do promotor são alvo de toxinas específicas e estímulos infecciosos para modificar os níveis de metilação (BARROS; OFFENBACHER, 2014).

1.6 Fumo e doença periodontal

As doenças periodontais são classificadas como distúrbios complexos, onde os fatores ambientais, de estilo de vida e genéticos contribuem para a sua etiologia. O fator ambiental mais importante é a microbiota diversa disposta em um biofilme que atua como um iniciador da destruição periodontal, enquanto fatores do estilo de vida, como hábitos de tabagismo e higiene bucal, atuam como modificadores da apresentação da doença (KARASNEH et al., 2017). O tabagismo é considerado um grande fator de risco, e muitos estudos demonstraram que o hábito de fumar altera o desenvolvimento e a progressão da periodontite. Outros fatores de risco que modificam a resposta do hospedeiro ao desafio da infecção bacteriana e podem induzir periodontite são álcool, dieta, poluição e drogas (CHO et al., 2017).

As primeiras observações sobre a relação entre o tabagismo e os tecidos periodontais ocorreram na década de 1940, quando Pindborg demonstrou que a gengivite ulcerativa necrotizante estava associada ao consumo de tabaco. Notavelmente, até a década de 1980, não houve estudos longitudinais, controlados por fatores de confusão, que forneceram forte evidência de tabagismo como fator de risco real para a periodontite. Posteriormente, vários estudos epidemiológicos, apresentando metodologias adequadas e análises estatísticas (ou seja, ajustes para variáveis de confusão), demonstraram claramente uma forte associação entre uso de tabaco / hábito de fumar e doenças periodontais em diferentes populações. Em geral, a evidência indica que os fumantes têm doença periodontal mais grave, com aumento na perda óssea, na aderência epitelial e perda dentária junto com recessão gengival, bem como formação de bolsas periodontais, do que os não-fumantes (NOCITTI et al., 2015).

Com base em estudos epidemiológicos, os fumantes têm (CP) mais grave do que os não fumantes e a relação dependente da dose, tanto em termos de número de cigarros fumados quanto de número de anos de tabagismo. Sugerindo que o aumento da severidade da periodontite entre os fumantes em comparação com os não fumantes é, em parte, induzido por diferenças no perfil bacteriano subgengival (KARASNEH et al., 2017).

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., 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).

Os estudos epigenéticos genômicos identificaram fortes associações entre a exposição ao fumo do tabaco e às alterações na metilação do DNA em locais únicos (CpG) em sangue total ou células mononucleares de sangue periférico isolado (PBMCs). Verificou-se que as alterações de metilação em CpGs são dinâmicas, mas reversíveis, indicando um potencial mecanismo de restabelecimento do estado de metilação do DNA após a cessação. Ademais, observou-se que as alterações de metilação em CpGs individuais persistiram após a cessação. Além das alterações de metilação do DNA relacionadas ao tabagismo em fumantes ativos adultos, há evidências fortes de estudos de recém-nascidos de que o tabagismo materno durante a gravidez, especialmente durante o segundo e terceiro trimestres, pode

contribuir para um padrão de metilação alterado no sangue do cordão umbilical, que também pode persistir por anos após o parto (BAUER et al., 2016).

Fumar causa mudanças de hipo e hipermetilação a longo prazo no DNA. Essas mudanças estão presentes não apenas em fumantes atuais, mas também em antigos fumantes (LOD et al., 2014).

Haffajee e Socransky (2001) descobriram que os fumantes apresentavam uma forma mais severa de periodontite com maior perda de inserção e bolsos mais profundos em comparação com ex-fumantes e não fumantes. Os resultados deste estudo também indicaram associação de aumento na perda de inserção com a idade, bem como a gravidade da doença. O aumento na perda de inserção pode ser o resultado de mudanças epigenéticas, Ohi *et al.* (2006) mostraram um aumento na metilação no colágeno tipo 1 $\alpha 1$ (*COL1 α 1*), uma proteína no ligamento periodontal, em indivíduos idosos em comparação com indivíduos mais jovens. Juntos, esses achados indicam que uma diminuição associada à idade no colágeno no ligamento periodontal é causada por modificações epigenéticas, mostrando assim que as modificações epigenéticas podem constituir como fator de risco para a periodontite (LOD et al., 2014).

Estudos que avaliam o padrão de metilação de genes de citocinas podem ter relevância para doenças inflamatórias em que a expressão de algumas citocinas é alterada, como na doença periodontal. Os achados preliminares sugeriram que o gene *IL-6* é hipometilado em tecidos de indivíduos com doença periodontal, em comparação com amostras de controle, sugerindo uma sobre expressão desta citocina nos tecidos inflamados. Além disso, a superexpressão da *IL-6* pode exercer uma influência epigenética. Essas descobertas são importantes, uma vez que a *IL-6*

é uma citocina chave envolvida na reabsorção óssea e foi detectada em níveis elevados em indivíduos com periodontite severa (TABBA et al., 2012).

1.7 Gene SOCS-1

A periodontite crônica é uma doença que resulta da interação dos mecanismos de defesa do hospedeiro com os microorganismos do biofilme. Entretanto, a mera presença dessas bactérias não é suficiente para desencadear o processo da doença. A destruição periodontal ocorre quando as bactérias encontram um hospedeiro susceptível, desencadeando a resposta imune e inflamação, que pode ser perpetuada em um indivíduo suscetível, se a doença não for tratada (ANDIA et al., 2015).

As citocinas representam uma grande família de glicoproteínas secretadas que atuam como fatores reguladores em processos biológicos importantes, incluindo desenvolvimento embrionário, resposta imune inflamatória e hematopoiese (LOTTEM; SACHS, 2002). As citocinas, portanto, possuem um papel central e fundamental na resolução do processo imune-inflamatório e assim podem diretamente interferir no prognóstico de uma doença. Todo este mecanismo depende de vias de sinalização intracelulares que são ativadas e desativadas, segundo as informações recebidas pelas células e que irão atuar direta ou indiretamente sobre o DNA no núcleo da célula, ativando ou inibindo a transcrição de certos genes. Quando as citocinas se ligam ao seu receptor de superfície celular elas ativam uma via de sinalização de transdução citoplasmática, responsável por carregar este sinal da superfície celular até o núcleo, resultando em alterações transcricionais (STARR; HILTON, 2004).

As SOCS compõem uma família de proteínas intracelulares e muitas delas participam da regulação das respostas das células imunes às citocinas. Há oito

proteínas da família SOCS: SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3, SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6, SOCS-7 E CIS. Cada uma delas possui uma região de homologia C-terminal com 40 aminoácidos conhecida como SOCS box. O SOCS Box é também encontrado em outras diversas proteínas com regiões centrais diferentes. As proteínas que contêm um domínio *SH2* nestas regiões centrais são classificadas como CIS e SOCS-1 SOCS-7. Adicionalmente, os membros da família SOCS contêm uma região N-terminal de sequência e tamanho variável, o que os diferencia entre si. Por exemplo: CIS, SOCS-1, SOCS-2 e SOCS-3 têm uma região N-terminal relativamente curta (50-80 resíduos) enquanto que os membros SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6 e SOCS-7 têm a região N-terminal maior, com mais de 380 resíduos. Análises da sequência de aminoácidos e estrutura genômica sugerem que pares destas proteínas estão mais relacionadas um com o outro do que com as proteínas SOCS no geral: CIS e SOCS-2, SOCS-1 e SOCS-3, SOCS-4 e SOCS-5, e SOCS-6 e SOCS-7, respectivamente (GUEDES; PLANELLO; ANDIA, 2015) (Figura 4).

Transcritos que codificam para SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3 e CIS estão frequentemente presentes nas células em níveis baixos, mas podem ser induzidos por uma grande variedade de citocinas, hormônios e fatores de crescimento. Há poucas evidências de que a expressão da SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6 e SOCS-7 seja induzida por citocinas (KREBS; HILTON, 2000).

Figura 4 - Estrutura das proteínas SOCS. Todos os oito membros da família de proteínas SOCS contém uma região N-terminal de comprimento e sequência variável, um domínio SH2 central e uma caixa SOCS-C terminal.

Fonte: Warren; Douglas (2004, p.C-2).

Uma das mais importantes cascatas de sinalização induzidas por citocinas é o transdutor de sinal Janus e a via de ativação da transcrição (*JAK-STAT*). Os supressores da sinalização de citocinas (SOCS) regulam a via *JAK-STAT*, atuando como moduladores de transdução de sinal em saúde e doença (BABON; NICOLA, 2012). Devido à sua capacidade de inibir diretamente *JAK*, SOCS-1 e SOCS-3 são os dois inibidores mais potentes da sinalização de citocinas (ANDIA et al., 2015).

JAK responde ao número de citocinas inflamatórias que se ligam a receptores cognoscitivos de citocinas, o que leva ao recrutamento de *STAT* ao receptor para a fosforilação por *JAK* e translocação nuclear para conduzir a expressão do gene alvo. As moléculas de *STAT* nucleares ativadas, em seguida, transcripcionalmente regulam diversas matrizes de citocinas e moduladores inflamatórios. (MEHRAZARIN; ALSHAIKH; KANG, 2017).

As Janus Kinases (*JAKs*) são constitutivamente associadas aos domínios citoplasmáticos dos receptores de citocina. A ligação da citocina ao seu receptor faz

com que haja dimerização das cadeias dos receptores justapondo as *JAKs* e levando a ativação destas através de transfosforilação. As *JAKs* ativadas fosforilam vários substratos na célula incluindo o *STAT*. Os *STATs* se ligam ao receptor fosforilado das *JAKs* através de seu domínio *SH2*. Uma vez ligados, os *STATs* são fosforilados o que causa sua dissociação do receptor. Os *STATs* formam dímeros e, então, migram para o núcleo da célula onde ativam a transcrição de genes que medeiam às respostas biológicas às citocinas (STARR; HILTON, 2004). Os genes *SOCS* são ativados em resposta a uma série de componentes da cascata inflamatória, sendo que sua expressão pode ser mediada, pelo menos em parte, pelos fatores de transcrição *STAT* (STARR; HILTON, 2004). A proteína, produzida pela transcrição do gene, participa de um “*negative feedback loop*”, ou seja, quando a citocina se liga a seu receptor de superfície celular, ativa a via de sinalização citoplasmática *JAK/STAT*; subsequentemente, as proteínas *STAT* se translocam para o núcleo e aumentam a transcrição de genes de resposta às citocinas, incluindo os genes *SOCS*. Já no citoplasma, as proteínas *SOCS* inibem a transdução do sinal do receptor de citocina para a via *JAK/STAT*. Portanto, a própria proteína é capaz de inibir a via de sinalização que originalmente estimulou sua produção (DAVEY; HEATH, STARR, 2006) (Figura 5).

Figura 5 - Função das proteínas SOCS-1. As proteínas SOCS-1 atuam em um loop de feedback negativo para atenuar a sinalização. Após ligação a seu receptor, as citocinas ativam a via JAK/STAT, resultando em um aumento na transcrição não só dos genes que medeiam o efeito biológico da citocina, mas também os genes SOCS. Uma vez produzidas, as proteínas SOCS podem inibir a sinalização por ligação a JAKs e receptores fosforilados e podem interagir com componentes de E3 ubiquitin ligases para JAK de poliubiquidação e direciona-los para a degradação proteasomal.

Fonte: Warren; Douglas (2004, p. C-3).

O gene *SOCS-1* é localizado no cromossomo 16p13.3 e pode ser induzido por citocinas que utilizam a via de sinalização *JAK-STAT*, incluindo *TNF- α* , *IL-6* e *interferão gama (IFN- γ)*, e mostrou-se que inibe a regulação positiva destas mesmas citocinas inflamatórias (MENEZES et al., 2008; YOSHIKAWA et al., 2001). Alguns pesquisadores sugeriram que a expressão do gene *SOCS* pode ser induzida por uma série de estímulos microbianos, incluindo lipopolissacarídeos e oligonucleótidos CpG, e que particularmente o *SOCS-1* é um regulador negativo dos efeitos inflamatórios induzidos pelos lipopolissacarídeos através da inibição da sinalização *TLR4* (MENEZES et al., 2008).

1.8 Mecanismo de ação do gene SOCS-1 em células inflamatórias e precursores de osteoclastos

A sinalização inflamatória desencadeada por lipopolissacarídeos (LPS) ou citocinas, como *TNF- α* e *IL-1 β* , pode envolver vários intermediários de sinalização tais como *JAK / STAT*, *TRAF6* e fatores de transcrição tais como *NF- κ B*, que iniciam transcrição de mRNA específica (mRNA^a, mRNA^b) no núcleo. O mRNA é traduzido em proteínas que exercerão suas funções biológicas após a secreção. A sinalização inflamatória também induz a expressão de genes SOCS (mRNA^{SOCS}), que é aumentada pela *IL-10*. A conversão de SOCS em proteínas não segregada permite a sua ação intracelular, que consiste na inibição da sinalização inflamatória, reduzindo assim os efeitos inflamatórios do LPS e citocinas (MENEZES et al., 2008) (Figura 6).

A interação de *RANKL* com o receptor *RANK* expressa por precursores de osteoclastos leva à sinalização intracelular que envolve *TRAF6* e ao fator de transcrição *NF- κ B*, o que leva à diferenciação e ativação dos osteoclastos e inicia-se transcrição de mRNA específica (mRNA^a e mRNA^b) no núcleo. Os osteoclastos ativados produzem enzimas como catepsina K e metaloproteinases de matriz (MMPs), envolvidas na reabsorção óssea. A expressão de SOCS (mRNA^{SOCS}), podem prejudicar a diferenciação e ativação dos osteoclastos através da inibição / degradação de *TRAF6* e *NF- κ B* (Figura 6) (MENEZES et al., 2008).

Figura 6 - Os mecanismos de ação de SOCS em células inflamatórias e precursores de osteoclastos.

A *SOCS action in inflammatory cells*

B *SOCS action in osteoclast precursors*

Fonte: Menezes et al (2008, p.8).

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

O tabagismo é um fator de risco para a doença periodontal que traz como consequências o aumento na destruição do tecido periodontal, alterações da produção das metaloproteinasas (MMP), interleucinas e marcadores inflamatórios (ANGAJI et al., 2010). Um recente estudo do tipo experimental demonstrou que o fumo do tabaco pode alterar o estado de metilação nos genes. A nicotina pode induzir diretamente a metilação do DNA (SOMA et al., 2006) causando alterações no epigenoma das células, e essas alterações por sua vez pode levar a mudança no padrão de expressão genética. (WAN et al., 2012). Na mucosa bucal de fumantes clinicamente saudáveis foi observado algumas mudanças tais como altas taxas de proliferação das células epiteliais, alterações nucleares e citoplasmáticas, como também o aumento no número de células queratinizadas. As alterações mais observadas é a metilação de DNA em células epiteliais da mucosa bucal no gene *SOCS-1*. (KREBS; HILTON, 2000).

A metilação do DNA é um mecanismo crucial no controle da atividade e da arquitetura genética que leva a diminuição ou até mesmo repressão genética. Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito do tabaco no perfil de metilação de DNA em células epiteliais da mucosa bucal no gene *SOCS1*. Garlet *et al.*, 2006 foram os primeiros autores a demonstrar a expressão de *mRNA* para os genes *SOCS-1*, -2, -3 em tecidos acometidos pela doença periodontal. Adicionalmente, observaram uma variação nos níveis desta expressão para as diferentes formas da doença, sugerindo que isso possa estar relacionado à natureza mais estável ou mais progressiva das lesões. Além das citocinas, os patógenos e seus produtos, como o LPS, também são capazes de induzir a expressão dos genes *SOCS* (ALEXANDER; HILTON, 2004; NAKAGAWA et al., 2002), sugerindo que *SOCS-1* possa funcionar como um

regulador negativo nas respostas ao LPS. A indução da expressão de SOCS também pode estar relacionada às lipoxinas, moduladores cruciais da resposta pró-inflamatória.

Estudos com camundongos knockout revelaram funções distintas e não redundantes para SOCS-1, na regulação das citocinas inflamatórias e no sistema imune (DAVEY; HEATH; STARR, 2006). Em modelo de artrite inflamatória aguda, com perfil do tipo *Th1* de citocinas, a severidade da inflamação sinovial e destruição articular foram mais fortes, quando comparadas às dos animais controles (EGAN et al., 2003). Em um estudo que verificou o papel de SOCS-1 durante a infecção com *C. pneumoniae* em camundongos, os autores concluíram que a presença da proteína controla a doença inflamatória letal que foi induzida pela infecção (YANG et al., 2008).

A expressão dos genes SOCS também foi alvo de dois estudos em pacientes com doença renal crônica. Em um deles, os autores relataram que sua expressão aumentada nas células mononucleares do sangue periférico pode ser correlacionada com a diminuição da função renal (RASTMANESH et al., 2008). Em estudo mais recente, no qual os pacientes já se encontravam em estágio terminal da doença, observou-se um aumento da expressão de SOCS-1, tanto em linfócitos quanto em monócitos. Houve, ainda, uma associação entre este aumento de expressão e inflamação sistêmica aumentada, que pode ser ilustrada por uma correlação significativa entre a expressão de SOCS nos monócitos e os níveis de *IL-6* no plasma. Concluíram, portanto, que esta expressão aumentada se reflete na extensão em que a inflamação sistêmica ativa as vias inflamatórias intracelulares (RASTMANESH et al., 2009).

Com base em descobertas de investigações recentes, uma revisão destacou que a metilação do DNA e as modificações das histonas ocorrem na mucosa oral em resposta às bactérias e aos processos inflamatórios. No entanto, o conhecimento do papel da epigenética no desenvolvimento de doenças periodontais ainda é limitado e existe apenas dois estudos com foco nos genes SOCS e metilação do DNA na periodontite (BAPTISTA et al., 2014; ANDIA et al., 2015). Uma vez que SOCS-1 e SOCS-3 são regulados nos níveis de transcrição e pós-tradução e essas proteínas são os dois inibidores mais potentes da sinalização de citocinas, o estado de metilação do DNA de SOCS dos genes, tornam-se um mecanismo importante a ser estudado nos tecidos periodontais. Quando a metilação ocorre nas regiões reguladoras do DNA do genoma, provavelmente regula negativamente a expressão gênica ou pode completamente silenciar a transcrição do gene interferindo no acesso de fatores de transcrição ao DNA (ANDIA et al., 2015).

Uma vez que a proteína SOCS-1 desempenha papel central na modulação da atividade de várias citocinas pró-inflamatórias em doenças, como a periodontite crônica, justifica-se conhecer a associação do gene SOCS-1, o fumo e a CP nos pacientes diante mencionado.

Proposição

3 Hipótese

Existe associação do tabagismo com a metilação no gene *SOCS-1* relacionado à doença periodontal.

3.1 Proposição

Verificar o padrão de metilação do DNA em células do epitélio oral de pacientes com periodontite crônica no promotor de um gene específico envolvido no controle da inflamação, como supressor da sinalização de citocinas (*SOCS -1*) em pacientes fumantes e não fumantes.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos do projeto

O projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto FORP/USP e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CEP-UFAL) realizado de acordo a Declaração de Helsinki com número de processo (CAAE: 57171816.2.0000.5419) e registrado no *ClinicalTrials.com* NCT03371446 (ANEXO A).

4.2 Casuística

Foi um estudo de tipo caso-controles, comparando dois grupos, um grupo com pacientes que fumam há mais de dez anos, com consumo de 10 a mais cigarros por dia e diagnóstico de periodontite crônica (teste). E outro grupo (controle) que foram pacientes não fumantes com periodontite crônica.

Para a seleção dos grupos de pacientes, os candidatos foram informados dos objetivos do estudo, bem como dos seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas, coletas e terapias que foram realizadas. Um profissional experiente explicou os procedimentos odontológicos que seriam realizados durante o estudo e os pacientes que concordaram em participar assinavam um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), respondendo a um questionário de saúde/anamnese, estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (APENDICE A) e preencheram uma ficha periodontal tendo em conta os critérios de inclusão (APENDICE B).

Todos os pacientes foram diagnosticados com periodontite crônica (PC) (Armitage, 1999). Os critérios de inclusão foram: 1) pacientes em boa saúde geral, 2) idade ≥ 30 anos, 3) 30% ou mais locais apresentando profundidade de sondagem ≥ 5 mm e nível de inserção clínica ≥ 5 mm com sangramento na sondagem 4) avaliação da gravidade da perda óssea alveolar determinada radiograficamente.

Os critérios de exclusão foram: (1) história positiva de tratamento periodontal nos últimos seis meses (2) envolvimento prostético extensivo (3) uso de anti-inflamatórios (4) gravidez ou aleitamento (5) doenças crônicas (como doenças autoimunes, diabetes e outros distúrbios endócrinos) (6) uso de anti-sépticos orais (por exemplo: clorhexidina) nos últimos seis meses (7) uso de aparelhos ortodônticos.

Sessenta pacientes (35 mulheres e 25 homens com idades entre 30 a 66 anos) foram alocados em dois grupos, pacientes com periodontite crônica e fumantes ($n = 30$) e apenas pacientes com periodontite crônica não fumantes (PC) ($n = 30$).

O grupo de pacientes fumantes foi constituído por pacientes com mais de 10 anos, consumindo mais de 10 cigarros por dia

Foram realizadas coleta de saliva e coleta de parâmetros clínicos periodontais, após a coleta, todos os pacientes receberam tratamento periodontal não cirúrgico de raspagem e alisamento radicular.

4.3 Parâmetros clínicos periodontais

Os parâmetros clínicos foram registrados na linha de base por um periodontista treinado. O índice de placa (IP) foi utilizado para avaliar o estado de

higiene bucal dos pacientes, determinado pela presença ou ausência de biofilme na margem gengival das quatro faces do dente e foi expresso como uma porcentagem de biofilme no total de superfícies dentárias. O sangramento na sondagem (SS) foi registrado com base na presença ou ausência de sangramento até 30 segundos após a sondagem em quatro lados de cada dente e foi expresso como uma porcentagem do sangramento. A profundidade da bolsa periodontal (PB) foi medida a partir da margem gengival livre até o final da bolsa periodontal e a CAL foi medida a partir da junção cimento-esmalte (CEJ) até o fundo da bolsa periodontal. PB e CAL foram medidos em seis locais por dente (mesio-bucal, bucal, disto-bucal, disto-lingual, lingual e mesio-lingual).

Todas as medidas de sondagem foram realizadas utilizando uma sonda periodontal da Universidade da Carolina do Norte - UNC (Hu- Friedy, Chicago, IL, EUA).

4.4 Coleta das amostras

Foram coletadas 60 amostras, na clínica de Pós-graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP (FORP-USP) (Figura 7). As células epiteliais foram colhidas após bochecho realizado com 5ml de dextrose auto clavada a 3% e armazenadas sob refrigeração a -20°C (ARON ET AL., 1994; AIDAR & LINE, 2007; TREVILATTO & LINE, 2000). Após coletadas as amostras foram levadas para o Laboratório de Epigenética e Reprodução do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (FMRP-USP) onde foi realizada a extração dos ácidos nucleicos e a análise molecular.

Figura 7 Esquematização da seleção final da amostra.

4.5 Análise Molecular

4.5.1 Extração de DNA genômico

O protocolo utilizado para extração do DNA genômico foi adaptado do protocolo de Olerup & Zetterquist (1992). Após descongelada a saliva, 2ml de cada amostra coletada foram transferidas separadamente para tubos tipo eppendorf, centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos e removido o sobrenadante, em seguida foi adicionado 1ml de tampão Phosphate-buffered saline PBS [NaCl 8g; KCl 0.2g; Na₂HPO₄ 1.44g; KH₂PO₄ 0.24g; Qsp 1000ml] e centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos, foi desprezado o sobrenadante e colocado 1ml de tampão de lise [

Sacarose 0,32M; Tris HCl (7,5) 12mM; MgCl₂ 5,0Mm; Triton-X 1,0%] após centrifugado por 40 segundos a 13000 rpm para a obtenção de *pellet* branco adicionou-se a proteinase K (5X) [NaCl 0.375M; EDTA (pH8,0) 0,12 M] 7,0µL de proteinase k (20ng/mL), 10µl de SDS 20% e 283,3 µL de água destilada, e deixado em overnight a 55°C . Após as amostras foram armazenadas no freezer a -20°C por 15 minutos. Posteriormente foi adicionado 120 µl de NaCl gelado e agitado por 8 segundos no Vortex, seguido por uma centrifugação a 13000rpm por 8 minutos para a pelletização da proteína desnaturada. 400µl do sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf e adicionou-se 1ml de etanol absoluto a 95% a -20°C e homogeneizado manualmente por inversão 2 ou 3 vezes para precipitação do DNA, seguido, foi armazenado no freezer a -85°C por 15 minutos. Após, foi realizada uma centrifugação a 0°C a 14000 rpm por 10 minutos e deixado em repouso no freezer a -20°C por 2 horas. Posteriormente, o material foi centrifugado a 0°C a 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1ml de etanol a 70% gelado (-20°C) e centrifugado a 0°C a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, o pellet foi seco, invertendo o eppendorf aberto sobre papel de filtro para secar por 5 minutos e centrifugado a 45°C por 20 minutos no Speed Vacuum. Em seguida, o material foi diluído em 50 µl de água Mili-Q cobaltada, incubado a 37°C em banho-maria por 1 hora e armazenado em freezer a -20°C. Ao final, a qualidade, pureza e integridade do DNA foram mensuradas através de espectrofotômetro (*NanoDrop 2000-Thermo Scientific*), utilizando a razão OD 260/280 e 260/230. Sendo considerados valores ideais para ambas as razões, entre ~1,8 e ~2,2. (Anexo B).

4.5.2 Conversão do DNA pelo Bissulfito de sódio

A molécula de DNA genômico purificada foi submetida à conversão pelo bissulfito de sódio (Kit de conversão EZ DNA Methylation – Gold™ Kit da Zymo Research catálogo Nos. D5005 & D5006), como explicado anteriormente as citosinas metiladas permanecem como citosinas e as citosinas não metiladas são transformadas em uracilas e depois lidas como timinas na reação de PCR. Esta metodologia foi realizada utilizando 20µl de DNA (200ng) ao qual foi adicionado 130µl do reagente de conversão CT (900µl de água, 300µl M-Dilution Buffer e 50µl M-Dissolving Buffer). As amostras foram colocadas no termociclador a 98°C por 10 minutos, 64°C por 2.5 horas e 4°C até o armazenamento. Em seguida, foi acrescentado 600µl de M-Binding Buffer a uma coluna e posteriormente as amostras foram passadas pela coluna de filtragem do kit da Zymo-Spin e centrifugadas a uma velocidade ($\geq 10,000 \times g$) por 30 segundos. A coluna foi lavada com M-Wash Buffer e centrifugada a uma velocidade máxima por 30 segundos. Após, adicionou-se 200µl de M-Desulphonation Buffer à coluna e deixou-se repousar à temperatura ambiente (20-30°C) por 15 a 20 minutos para desnaturação do DNA. Após a incubação, a amostra foi centrifugada em velocidade máxima por 30 segundos. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens seguidas com 200µl de M-Wash Buffer e centrifugado por 30 segundos. A coluna foi transferida para um novo eppendorf de 1.5 ml. Na matriz da coluna, foi adicionado 10 µl de M-Elution Buffer e centrifugado por 30 segundos a alta velocidade. O DNA foi armazenado a -20°C por um dia, antes da sua utilização (Figura 8).

Figura 8 - Esquemática do procedimento de conversão com Kit de conversão EZ DNA Methylation – Gold™ Kit da ZYMO RESEARCH. Modificado do protocolo do fabricante.

Fonte: Zymo Research (2017, s/n).

4.5.3 Escolha dos Primers

O desenvolvimento da técnica iniciou-se pela escolha dos primers desenhados previamente (WEBER et al., 2005) (ANEXO C). A sequência original do gene *SOCS-1* foi testada e convertida pelo programa Methyl Primer Express v.1.0 (Applied Biosystems), que ambas nos dá as possíveis sequências: metiladas e não metiladas. A partir disto, um trecho próximo à ponto de início de transcrição do gene

foi escolhido (posição física no cromossomo GRCh38:16:11253655:11256929:-), por ser uma região regulatória e, por tanto, susceptível ao controle epigenético, foi conferido o desenho dos primers com o auxílio do software GeneRunner (versão 3.05- sob licença livre da Hasting Software, 1994) e a manufatura dos primers esteve a cargo da THERMOFISHER (sequência sense M2F: 5' – TGAAGATGGTTTCGGGATTTACGA-3'(TGAAGATGGCCTCGGGACCCACGA) (vide em vermelho na figura 09-A) e antisense M2R: 3' ACAACTCCTACAACGACCGCACG 5' (CGTGCGGCCGCTGCAG GAGCTGT) (vide em vermelho na figura 09-A) para metilado e sense U2F:5' – TGAAGATGGTTTTGGGATTTATGA 3' (TGAAGATGGCCTCGGGACCCACGA (vide em destaque na cor verde conforme apresenta a figura 09-B) e antisense U2R:3' CACAACTCCTACAACAACCACACAC-5' (GCGTGCGGCCGCTGCAGGAGCTGTG) (vide em destaque na cor vermelha apresentada na figura 09-A) para não metilado que geram um amplicom de 184 pares de base (pb) para metilado e 183 pares de base (pb) para não metilado (WEBER et al., 2005) (Figuras 9 e Tabela 1).

Figura 9-A: Representação esquemática do amplicon de 184 pb do fragmento de interesse do gene *SOCS-1* a sequência de primers metilado está representado por letras vermelhas. B: Representação esquemática do amplicon de 183 pb do fragmento de interesse do gene *SOCS-1* a sequência de primers não metilado está representado por letras verdes.

CACCCCGGAGCGCTATGGCCACCCCTCGGCTTGGCCCTTCTGTAGGATGGTAGCACACAACCGGTGGCAGCCGACAAATGCAGTCTCCACAGCA
 GCAGAGCCCGGACGGCGGCCAGAACCTTCTCTCTCTCTCTCGCCGCGGGCCCGCGCGCCCGGGCCGTGCCCGCGGTCCCGGCC
 CGGCCCGCGGACACGCATTCCGCACATTCGGTTCCACGCCGATTACCGGCGCATCACGCGCGCCAGCGCGCTCTGTGACGCTCGGGATTC
 TACTGGGGGCCCTGAGCGTGCACGGGGCGCACGAGCGGCTGCGCGCCGAGCCCGTGGGCACCTTCTGGTGGCGACAGCCGCCAGCGGAAT
 GCTTTTTCCGCTTAGCGTGAAGATGGGCTCGGGACCCACGAGCATCCGCGTGCACITTCAGGGCCGGCCCTTTCACCTGGATGGCAGCCGCGAGA
 GCTTCCAGTGGCTCTTCGAGCTGCTGGAGCACTAGTGGCGGGCGCGCGCCGATGCTGGGGGCCCGCTGCGCCAGCGCGCGTGGCGCGCGCT
 GCAGGAGCTGTGCCGCCAGCGCATGTTGCCACCGTGGGCCGCGAGAACCTGGCTCGCATCCCTCAACCCGCTCTCCGCGACTACCTGAGCT
 CCTTCCCTTCCAGATTGACCGGCAGCGCCCGCGTGCACGCAGCATTAACTGGGATGCCGTGTATTTTGTATTACTTGCTTGAACCATGTGG
 GTACCTCCCGGCTGGGTGGAGGGAGCGGATGGGTGAGGGGCGAGGCGCTCCGCGCTCGGCTGGAGAGGAGGCGCAGACCCCTTCTC
 ACCTCTGAGGGGCTCTCCCTCTGGTGTCTCCCTTGGGTCCCCCTGGTGTGTAGCAGCTTAACTGTATCTGAGCCAGGACCTGAACCTCGC
 ACCTCTACCTCTTCATGTTACATATACCGAGTATCTTGCACAAACAGGGGTGGGGGAGGGTCTCTGGCTTATTTTCTGCTGTGCAGAACTCT
 ATTTATATTTTTAAAGTCAGTTAGGTAATAAATTTATTATGAAAGTTTTTTTTTAAAAAATAAGTTTCTAGCGAGTGTGCTTTGCCAAAAGTT

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9-B: Representação esquemática do amplicon de 183 pb do fragmento de interesse do gene *SOCS-1* a sequência de primers não metilado está representado por letras verde.

CACCCCGGACGCTATGGCCCAACCCCTCGGCTGGCCCTTCTGTAGGATGGTAGCACAAACAGGTGGCAGCCGACAATGCAGTCTCCACAGCA
 GCAGAGCCCGACGGCGGCCAGAACCTTCTCTCTTCTCTCTCTCGCCCGGGCCCCCGCGCGCCCGCGGCCGTGCCCGCGGTCCCGGCC
 CGGCCCCCGCGACACGCACTTCGCACATCCGTTCCGACGCCGATTACCGCGCATCAGCGCGCCAGCGCGTCTCTGGACCGTTCGGGATTC
 TACTGGGGGCCCTTAGCGTGCAGGGCGCAGCAGAGCGCTGCGCGCCGAGCCCGTGGCACCTTCTGTTGCGCGACAGCCGCCACGGAACT
 GCTTTTTCCGCCCTTAGCGTGAAGAGGGCTCGGGACCCAGGTCATCCGGCTGCATCTTCAGGCGCGGCCCTTTCACCTGGATGCAGCCGCGAGA
 GCTTCGACTGCTCTTCGAGCTGCTGGAGCACTAAGTGGCGCGCGCGCGCTGCATGCTGGGGGCCCGCCCTGCGCCAGCGCGCGTGGCGCGCT
 GCAGGAGCTGTGCCCAGCGCATCGTGCCACCCTGGGCGCGAGAACCCTGCTCGCATCCCTCAACCCGTCTCGCGACTACCTGAGCT
 CCTCCCTTCAGATTGACCGGCAGCGCCCGCCGTGCAGCGAGCATTAACTGGGATGCCGTGTTATTTGTTATTACTTGCCTGGAACCATGTGG
 GTACCTCCCGGCTTGGTGGAGGGAGCGGATGGGTAGGGGCGAGGCGCTCCCGCCCTCGGCTGGAGAGGAGGCGCAGACCCCTTCTC
 ACCTCTGAGGGGCTCTCCCTCTGCTGCTCCCTCTGGTCCCTGTTGTGTAGCAGCTTAACGTATCTGAGGCCAGGACCTGAACCTCGC
 ACCTCTACCTCTTCATGTTACATATACCAAGTATCTTGCACAAACAGGGGTGGGGGAGGGTCTCTGCTTATTTTCTGCTGTGCAGAACTCT
 ATTTTATATTTTTAAAGTCAGTTAGGTAATAAATTTATTATGAAAGTTTTTTTTTAAAAAAAATAAGTTTCTAGCGAGTGTGCTTTGGCCAAAAGTT

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 1- Caracterização e localização da sequência dos Primers dentro do fragmento de interesse na região do cromossomo GRCh38:16:11253655:11256929.

Amplicon	Primer	Sequência (5'-3')	RevCompl	SeqOrig (sense)	Primer p/ BLAST
184	M2F	TGAAGATGGTTTCGGGATTACGA		TGAAGATGGCCTCGGGACCCACGA	TGAAGATGGCCTCGGGACCCACGA
	M2R	ACAACCTCTACAACGACCGCACG	CGTGCGGTCGTTGTAGGAGTTGT	CGTGCGGCCGCTGCAGGAGCTGT	ACAGCTCCTGCAGCGGCCGCACG
183	U2F	TGAAGATGGTTTGGGATTATGA		TGAAGATGGCCTCGGGACCCACGA	TGAAGATGGCCTCGGGACCCACGA
	U2R	CACAACCTCTACAACAACCACACAC	GTGTGTGGTTGTGTAGGAGTTGTG	GCCTGCGGCCGCTGCAGGAGCTGTG	CACAGCTCCTGCAGCGGCCGCACGC

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Ensaios qualitativos

Os ensaios qualitativos, MS-PCR (do inglês, Methylation Specific PCR), envolvem, inicialmente, uma etapa de modificação do DNA pelo bissulfito de sódio. Nesta técnica, as bases nucleotídicas citosinas são convertidas in vitro em bases uracilas nas moléculas do DNA tratado, porem estas conversões não ocorrem quando as citosinas se encontram metiladas. De acordo com Clark et al (1994), após esta modificação do DNA com bissulfito de sódio, as amostras podem ser analisadas quanto ao padrão de metilação com base na presença de citosinas, que permanecem no DNA após a modificação com bissulfito de sódio (citosinas metiladas).

4.7 Análise de metilação do DNA

4.7.1 PCR metilação-especifica (MS-PCR)

A região escolhida para análise no promotor do gene *SOCS-1* foi submetida à análise da presença de ilhas CpG no programa CpGplot. Esta análise seguiu os parâmetros estipulados pelo CpGplot que reconhece como ilha CpG uma região de

DNA maior que 200pb 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 técnica (PCR-MSP) foi realizada para avaliar o padrão de metilação do *SOCS-1* e consiste na diferenciação de fragmentos metilados e não metilados de uma determinada região do DNA modificada por bissulfito de sódio (HERMAN et al., 1996), utilizando primers específicos para apenas um tipo de fragmento.

Após realização de alguns ajustes para otimizar o ensaio, a padronização final da reação para cada amostra na região de interesse do gene *SOCS-1* teve o meio de reação (mix), composto por: Tp 2,5; $MgCl_2$ 0,75mM; dNTP 0,25 mM; Primers F e R 1 μ l respectivamente a 10pM; Amplitaq Gold DNA Polimerase 0,5 μ l; água destilada e deionizada 17 μ l e 2 μ l de DNA convertido por bissulfito.

A ciclagem ou programa do termociclador eletrônico programável (modelo BioradC 1000t®), independentemente do número de amostras foram: desnaturação inicial 94°C por 5 minutos, 36 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58,8°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, extensão final de 72°C por 10 minutos e 12°C para finalizar e inativar a reação.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídio em câmara escura e iluminação reversa por fonte de luz ultravioleta.

4.8 Análises Estatísticas

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa estatístico R version 3.3.2 Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, vienna, Austria. (URL <https://www.R-project.org>).

Para caracterizar os grupos (Fumantes e Não Fumantes) nas variáveis: idade, sexo, NCI, profundidade de sondagem, número de dentes e raça em ambos os grupos e as variáveis como consumo de cigarros por dia e consumo em anos somente no grupo dos fumantes, foram usados Teste t de Student para amostras independentes e teste não paramétrico de Wilcoxon para variáveis qualitativas foram utilizados teste qui-quadrado e teste exato de Fisher.

Para a variável metilação, foi feito um teste exato de Fisher para testar a associação entre os grupos e a metilação. Valores de p inferiores ao nível de significância adotado ($\leq 0,05$) trazem evidências de associação entre as variáveis.

Resultados

5 RESULTADOS

Fumantes com periodontite crônica mostraram 33,33% (n=8/24) de metilação do DNA no promotor do gene *SOCS-1* de células da saliva, enquanto menos de 5% (4,76%; n= 1/21) de não-fumantes apresentaram metilação (p=0,0275). Quinze amostras foram excluídas da análise molecular por apresentarem resultados inconclusivos, uma vez que apenas a hiper ou hipometilação completa de *SOCS-1* poderia ser informativa neste estudo (figura 10). Além disso, os fumantes apresentaram 7,08 (1,95-51,44) vezes mais chances de apresentar periodontite crônica com um padrão de metilação no gene *SOCS-1* (Tabela 2).

Figura 10. A frequência de metilação do promotor *SOCS-1* para células epiteliais da mucosa oral de não fumantes e fumantes com periodontite crônica. B. Amplicons para o estado metilado (184pb) ou não metilado (183pb) do promotor do gene *SOCS-1* em DNA extraído de amostras de saliva de pacientes fumantes (PF) e não fumantes (PNF) com periodontite crônica. M= metilado; U= não metilado.

A

B

Tabela 2- Frequência de metilação do promotor SOCS-1 em pacientes com periodontite crônica fumantes (ChP/S) e não fumantes (ChP).

Padrão de Metilação	ChP	ChP/S	Total
Metilado	20	16	36
Não Metilado	1	8	9
Total	21	24	45

Risco Relativo = 7,08 (1,9524 ; 51,4473)*

*IC = 95%

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação aos dados sociodemográficos, nem a idade, nem o gênero nem a etnia apresentaram diferença entre os grupos ChP / S e ChP. Para os parâmetros de gravidade da doença, a profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica (CAL) foram significativamente mais severos em ChP / S quando comparados a não-fumantes, mas esses parâmetros não se correlacionaram com o status de metilação do SOCS-1 (Tabela 3)

Tabela 3. Dados sociodemográficos e clínicos de pacientes com periodontite crônica em relação ao status de fumante ou padrão de metilação.

Variável		ChP/S	ChP	p value
Idade		47,40 (7,31)	47,87 (7,94)	0,8138 ^a
Sexo	Masculino	15	20	0,2949 ^b
	Feminino	15	10	
Etnia	Caucasico	21	20	0,5317 ^c
	Moreno	2	5	
	Negro	7	5	
Parâmetros de severidade	PB	4,36 (1,24)	5,11 (1,18)	0,0202 ^a
	CAL	4,39 (1,19)	5,54 (1,02)	0,0001 ^a
Variável		Metilado	Não metilado	p value
Parâmetros de severidade	PB	4,67 (1,20)	5,18 (1,23)	0,3804 ^a
	CAL	5,22 (0,98)	5,59 (1,12)	0,6596 ^a

^a Student's T-test for independent samples; ^b Chi-square test; ^c Fisher exact test.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Até onde sabemos este é o primeiro estudo investigando o padrão de metilação do DNA no gene *SOCS-1* para avaliar o efeito do tabagismo na periodontite crônica. Nossos resultados indicam que pacientes com periodontite crônica fumantes tem um risco relativo maior de apresentar um padrão de metilação do gene *SOCS-1* em relação a pacientes que não fumam, o que nos faz pensar que o fumo como fator ambiental em conjunto a outros fatores intrínsecos do hospedeiro nomeadamente genéticos possam desencadear a secreção de citocinas pro inflamatórias contribuindo para a susceptibilidade à doença periodontal através da infecção microbiana (Herrero E.R, 2016; Darveau R.P 2010) e o desenvolvimento de malignidade (Hecht SS, 1999) muitas variações no DNA associados a um status diferente de metilação podem ser importantes no contexto dos aspectos biológicos e clínicos desta doença.

Recentemente, marcadores genéticos (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10) que identificam indivíduos com maior risco de desenvolver doença periodontal foram descobertos (Stefani, 2013; Ishida, 2012; Oliveira, 2011-2009; Andia, 2010; McGuire, 1999). Em trabalhos anteriores (McGuire, 1991 & 1996) os autores concluíram que existe uma relação entre doença periodontal, perda dentária e prognóstico, mas que a natureza exata e a inter-relação entre esses fatores não eram claras, em particular sugeriu-se incluir outros fatores que tiveram uma significativa relação à doença, outro estudo (Löe H, 1986) demonstraram que a presença isolada de bactérias não explicavam a progressão da doença periodontal e que fatores anatômicos não poderiam predizer o desfecho da doença deste modo, diversos autores publicaram uma série de trabalhos explorando os mecanismos imunológicos (Genco R.J, 1986; Seymour, 1987; Ranney, 1991), evidências também associam a predisposição genética à periodontite

(Michalowicz, 1991-1993-1994-2000), embora a genética determine a capacidade inflamatória de um indivíduo, há evidências crescentes de que a epigenética é fundamental para regular a resposta inflamatória de maneira dinâmica (Kellermayer, 2012; Oliveira, 2009; Diehl, S.R, 1999; Gore, 1998) concluindo que a progressão e manifestação da doença pode ser influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos como o fumo.

Fatores ambientais afetam as células hospedeiras principalmente através da indução da variação da sequência gênica, alterando assim certas estruturas teciduais e desencadeando a resposta de anticorpos e regulação de mediadores inflamatórios (Li Xinting, 2018). A repressão transcricional causada pela metilação do DNA parece ser mediada pela família da proteína de ligação (MBP), como MeCP1 e MeCP2 (Wade 2001). Enquanto MeCP1 requer múltiplos locais CpG metilados para se ligar ao DNA e promover a condensação da cromatina, a proteína MeCP2 é capaz de se ligar a apenas um sítio CpG metilado. Sabe-se que a interação entre apenas um sítio CpG e elementos potenciadores de DNA pode ser suficiente para modificar a transcrição gênica (Bird, 1986). Estudos de padrões de metilação do DNA surgiram como um importante campo de pesquisa na doença periodontal (Baptista, 2014; Stefani, 2013; Andia, 2010; Oliveira, 2009). Na condição de doença periodontal um padrão hipometilado do DNA em pacientes fumantes ou não fumantes com periodontite crônica está intimamente associado à ativação transcricional de genes inflamatórios (Larsson, 2014; Jones P.A, 1999) aumentando o risco ao desenvolvimento da doença. Garlet & colaboradores em 2006 foram os primeiros autores a demonstrar a expressão de mRNA para os genes *SOCS-1,-2,-3* em tecidos acometidos pela doença periodontal, *SOCS-1* afeta a sinalização de

vários intermediários pró-inflamatórias desencadeados por lipopolissacarídeos (LPS) ou citocinas que comumente são encontradas em altos níveis de expressão na inflamação crônica e doença periodontal associada à destruição tecidual (Guedes, 2015) como TNF- α e IL-1 β que iniciam a transcrição de mRNA no núcleo da célula na resposta inflamatória periodontal e o RANKL no processo de reabsorção óssea regulando a via JAK-STAT, TRAF6 e a via de transcrição NF κ B (Menezes, 2008).

Já foi observada correlação negativa entre os níveis de mRNA *SOCS-1* com parâmetros clínicos de gravidade da doença periodontal (profundidade de sondagem e nível clínico de inserção) (Garlet, 2006), acreditamos que este mecanismo esteja envolvido na regulação negativa das citocinas inflamatórias e correlacionado com o mecanismo regulatório do processo inflamatório, responsável pela destruição da doença periodontal. Conforme demonstrado nas medições clínicas de nosso estudo, mesmo não tendo realizado análise de expressão de RNA no gene *SOCS-1* tais evidências nos faz pensar que essa correlação entre o gene e os parâmetros clínicos periodontais podem refletir na sua gravidade além do fator fumo.

O epigenoma encontra-se susceptível a alterações por vários fatores, sendo o tabaco um fator de risco para a doença periodontal (Gomez, 2009) provocando alterações a longo prazo de hiper e hipometilação (Lod, 2014). Em geral, a evidência indica que os fumantes tem doença periodontal mais grave com aumento na perda óssea, recessão gengival, bem como formação de bolsas periodontais profundas e aumento ao sangramento ao sondagem do que os não fumantes (Nocitti, 2015).

Por análise de associação (teste exato de Fisher) entre os grupos de estudo e a variável metilação, revelou diferença estatisticamente significativa dependendo do estado de fumar, quando fumantes contra não fumantes trazendo evidências de padrão não metilado e um padrão metilado predominantemente no grupo fumantes isso pode ser explicado por alterações na expressão genica causada pelo tabagismo ou número de cigarros fumados por dia (Paul S, 2014; Spitz M.R, 1998; Noble E.P, 1998) variações relacionadas ao sexo (Paul S, 2014) ou hábitos pessoais (Davies GE, 2009) e diferentes fatores que podem provocar respostas celulares resultando em danos às estruturas e funções moleculares promovendo diversas condições patológicas (Poljšak B, 2012). Possivelmente, a metilação do DNA em *SOCS-1* é mais uma consequência da exposição ao cigarro do que algo diretamente relacionado à periodontite. Embora pacientes que fumam apresentem metilação do *SOCS-1* mais frequentemente que os que não fumam, a metilação do DNA neste gene pode não representar um marcador de severidade para periodontite. Curiosamente somente um estudo avaliando padrão de metilação, fumo e doença periodontal crônica foi achado, Oliveira e colaboradores em 2009 onde avaliaram o estado o promotor do gene *IL8* em pacientes fumantes e não fumantes com periodontite crônica e observaram um padrão de não metilado em ambos os grupos, corroborando nossos resultados. Outros estudos sobre padrão de metilação foram achados onde compararam grupos saudáveis e com doença periodontal em diferentes tipos de citocinas e genes pro inflamatórios *TLR2* (Amormino, 2013) *IL-6* (Stefani, 2013) *TLR2* e *TLR4* (Oliveira, 2011) *IL-10* e *IFN- γ* (Viana, 2010) *IL-8* (Andia, 2010) onde relataram variações na metilação do DNA nos genes achando um padrão não metilado. O gene *SOCS-1* também foi alvo de estudos de metilação onde somente dois papers avaliando a inter-relação desse gene com a doença

periodontal sem fator fumo foram achados (Baptista, 2014) em periodontite agressiva e (Andia, 2015) na periodontite crônica onde foi observado um padrão de não metilado consistente esses resultados e corroborando nossos dados indicaram que padrões de metilação podem influenciar a produção de citocinas e por tanto a doença. Já foi estudado associação entre polimorfismo de *SOCS-1*⁸²⁰ e periodontite crônica (Guedes, 2015), principalmente nos casos de doença mais severas, havendo diminuição da frequência do alelo, o qual possui efeito protetor nos indivíduos que apresentam perdas grandes de inserção conjuntiva, esses achados nos faz refletir que além do padrão de metilação há também outros pontos genéticos que podem influenciar a doença.

Coletivamente, é concebível que tanto padrões de metilação do DNA relacionados ao tabagismo quanto perfis de expressão gênica reflitam um aumento da sensibilidade dos pacientes com periodontite aos riscos ambientais, como o tabagismo. Neste estudo, obtivemos amostras inconclusivas que não apresentaram nenhum padrão possivelmente produto de erro da técnica durante o processo de conversão pelo bissulfito de sódio que degrada o DNA ou pela possibilidade de um padrão de metilação mosaico (Miyoshi, 2004). Não foram analisados pacientes sem doença periodontal, porque se buscava correlacionar exposição ao tabaco, severidade da doença e metilação do DNA, e não a metilação como marcador de presença ou ausência da periodontite. Assumimos que o padrão de metilação do DNA no gene *SOCS-1* foram localizados em posições próximas aos locais de início da transcrição; no entanto, a metilação nesses locais não conseguiu explicar todos os aspectos epigenéticos porque não foi possível analisar níveis de expressão RNA ou proteínas, e que apesar de ter obtido metilação no *SOCS-1* em fumantes, não se

correlacionou com os parâmetros de severidade da periodontite, provavelmente é porque a metilação nesse gene também é uma consequência da exposição ao cigarro, e que poderia ter uma causa comum com a periodontite, podendo ou não estar relacionado, sugerindo a necessidade de mais estudos que visa identificar elementos funcionais abrangentes no genoma humano, doença periodontal e fatores estressantes como o fumo.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Concluimos que, nas células epiteliais da mucosa bucal, os dinucleotídeos CpG investigados no promotor do gene *SOCS-1* apresentam maior hipometilação nos grupos afetados pela periodontite, tanto em fumantes como em não fumantes. Possivelmente, esse mecanismo pode ser um dos fatores que participa do processo da doença e, portanto, importante na etiologia e patogênese da doença periodontal.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS

AIDAR M & LINE SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. **Brazilian Dental Journal**, V. 18, 148-152.2007.

ALEXANDER, W.S; HILTON, D.J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. **Annu Rev Immunol**, v.22, p. 503529, 2004. Victoria. Disponível em:<<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.immunol.22.091003.090312>>. Acesso em: 18 out. 2017.

AMORMINO, S.A.F., et al., Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. **Hum Immunol**, v.74, n..9, p.1231-1236, 2013. Belo Horizonte. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/23747679>>. Acesso em: 28 set. 2017.

ANDIA, D.C., et al. DNA methylation status of the IL8 gene promoter in aggressive periodontitis. **J Periodontol**, v. 81, p. 1336-1341. 2010. Piracicaba. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20450371>>. Acesso em: 18 out. 2017.

_____. et al. DNA methylation analysis of SOCS1, SOCS3, and LINE-1 in microdissected gingival tissue. **Clin Oral Invest**, v.19, p. 2337-2344, 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00784-015-14601>>. Acesso em: 18 set. 2017.

ANGAJI, M., et al. A systematic review of clinical efficacy of adjunctive antibiotics in the treatment of smokers with periodontitis. **J Periodontol**, v.81, n.11, p.1518–1528, 2010. Winnipeg. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20583918>>. Acesso em: 12 jul. 2017.

ANGRISANO, T., et al. LPS- induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. **BMC Microbiol**, v.10, n.172, 2010. Disponível em: <<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-10-172>>. Acesso em: 08 jun. 2017.

ARI, G; Cherukuri, S; Namasivayam, A. Epigenetics and Periodontitis: A Contemporary Review. **J Clin Diagn Res**. v.10, n.11, ZE07-ZE09, 2016. Tamil Nadu. Disponível em: <http://jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973709x&year=2016&volume=10&issue=11&page=ZE07&issn=0973-709x&id=8864>. Acesso em: 14 jun. 2017.

ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**, v.4, n.1, p.1-6, 1999. California. Disponível em: <<http://www.joponline.org/doi/10.1902/annals.1999.4.1.1>>. Acesso em: 18 out. 2017.

ARON Y, SWIERCZEWSKI E & LOCKHART A. A simple and rapid micromethod for genomic DNA extraction from jugal epithelial cells. Application to human lymphocyte antigen typing in one large family of atopic/asthmatic probands. **Allergy**, V. 49, 788-790.1994.

ASA'AD, F.; et al. Evaluation of DNA methylation of inflammatory genes following treatment of chronic periodontitis: A pilot case- control study. **J Clin Periodontol**, v. 44, p. 905-914, 2017. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/enhanced/exportCitation/doi/10.1111/jcpe.12783>>. Acesso em: 30 jul. 2017.

BABON, J.J; NICOLA, N.A. The biology and mechanism of action of suppressor of cytokine signaling 3. **Growth Factors**, v.30, p.207-219, 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/08977194.2012.687375?journalCode=igrf20>>. Acesso em: 18 out. 2017.

BAGAITKAR, J., et al. Tobacco-induced alterations to Porphyromonas gingivalis-host interactions. **Environ Microbiol**, v.11, n.5, p.124-253, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2713102/>>. Acesso em: 22 set. 2017.

BAJIC, V.B.; et al. Promoter prediction analysis on the whole human genome. **Nat Biotechnol**. v.22, n.11, p. 1467-1473, 2004. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nbt1032/>>. Acesso em: 28 ago. 2017.

BAPTISTA, N.B., et al. DNA methylation levels of SOCS1 and LINE-1 in oral epithelial cells from aggressive periodontitis patients. **Arch Oral Biol**, v.59, p.670-678, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769218>>. Acesso em: 18 out. 2017.

BARROS, S.P; OFFENBACHE, O. Modifiable risk factors in periodontal disease. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response. **Periodontology**. 2000, v.64, p.95-110, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24320958>>. Acesso em: 13 out. 2017.

BAUER, M., et al. Tobacco smoking differently influences cell types of the innate and adaptive immune system-indications from CpG site methylation. **Clin Epigenetics**, v.8, n.83, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4973040/>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

BENJAMIN, A.P. **Genetics: A conceptual Approach**.1 Ed. Worth Publishers INC, US. 2003.

BESTOR, T.H. The DNA methyltransferase of mammals. **Hum Mol Genet**, v.9, n.16, p.2395-2539, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005794> >. Acessado em 18 out. 2017.

BIRD, A.P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature**, v.321, n.6067p. 209-213, 1986. Disponível em:< <https://www.nature.com/articles/321209a0> >. Acesso em: 05 set. 2017.

_____. Perceptions of epigenetics. **Nature**, V.447, n. 24, p. 396-398, 2007. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522671>>. Acesso em: 18 out. 2017.

BLASCO-BAQUE, V., et al. Periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. **Gut**, v. 66, n.5, p.872-885, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26838600>>. Acesso em: 22 set. 2017.

BOURC'HIS, D. et al. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. **Science**, v. 294, p. 2536-2539, 2001. Hanover. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/294/5551/2536>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

CHEN, C.Y., et al. SOCS1 Methylation in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v.37, p. 300-305, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/gcc.10222/abstract>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

CHENG, C., et al. SOCS1 hypermethylation mediated by DNMT1 is associated with lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines in macrophages. **Toxicol Lett**, v.225, n.3, p. 488_497, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427414000137?via%3Dihub>>. Acesso em: 03 nov . 2017.

CHO, Y.D., et al. Transcriptomics and methylomics in chronic periodontitis with tobacco use: a pilot study. **Clin Epigenetics**, v.10, n.9, p.81, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s13148-017-0381-z>>. Acesso em: 18 out. 2017.

HE, C.Y; GAO, X.Q; JIANG, L.P. The impact of smoking on levels of chronic periodontitis- associated biomarkers. **Exp Mol Pathol**, v.101, p. 110-115, 2016. Disponível em:< <http://europepmc.org/abstract/med/27450647>>. Acesso em: 07 jul. 2017.

CLARK, S.J., et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acid Res**, v.22, p. 2990-2997, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC310266/>>. Acesso em: 18 set. 2017.

CORINNE, N; SIMONTI; JOHN, A; CAPRA. The evolution of the human genome. **Curr Opin in Genet Dev**, v. 35, p. 9-15, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26338498>>. Acesso em: 18 out. 2017.

DAVEY, G.M; HEATH, WR; STARR, R. SOCS1: a potent and multifaceted regulator of cytokines and cell-mediated inflammation. **Tissue Antigens**, v. 67, n.1, p. 1-9, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16451196>>. Acesso em: 17 ago. 2017.

EGAN, P.J., et al. Suppressor of cytokine signaling-1 regulates acute inflammatory arthritis and T cell activation. **J Clin Invest**, v. 111, n.6, p.915-924,2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC153765/>>. Acesso em: 18 jul. 2017.

FEIL, R; FRAGA, M.F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 2, p. 97-109, 2012. Disponível em:< <https://www.nature.com/articles/nrg3142>>. Acesso em: 18 out. 2017.

GABRIEL, H.E., 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**, V. 83, n.4, p. 835-41. 2006. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16600936>>. Acesso em: 20 out. 2017.

GANESAN, S.M., et al. A tale of two risks: smoking, diabetes and the subgingival microbiome. **ISME J**, v.11, p. 2075-2089, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ismej201773>>. Acesso em: 11 out. 2017.

GARLET, G.P., et al. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? **J Periodontal Res**, v.41, n.6, p.580-584, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17076785>>. Acesso em: 01 set. 2017.

GIANNOPOULOU, C; KAMMA, J; MOMBELLI, A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. **J Clin Periodontol**, v. 30, n.2, p.145-153, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12622857>>. Acesso em: 18 out. 2017.

GOLL, M.G., et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog DNMT2. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 395-398, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424344>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

GOMEZ, R.S; DUTRA, W.O; MOREIRA, P.R. Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. **Inflamm Res**, v.58, p. 625-629. 2009. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19440658>>. Acesso em: 18 out. 2017.

GRIFFITHS, E.A., et al. Epigenetic differences in cytogenetically normal versus abnormal acute myeloid leukemia. **Epigenetics**, v.5, p.590-600, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3052845/>>. Acesso em: 18 jul. 2017.

GROVER, V., et al. Epigenetics and periodontal disease: Hope to Tame the Untameable. **Curr Gene Ther**, v.14, p.473-481, 2014. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/124723/article>>. Acesso em: 30 out. 2017.

GUEDES, R.A; PLANELLO, A.C; ANDIA, D.C. Association of SOCS⁻⁸²⁰ (rs33977706) gene polymorphism with chronic periodontitis: A case-control study in Brazilians. **Meta Gene**, v.5, p. 124-128, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4506993/>>. Acesso em: 22 set. 2017.

HAFFAJEE, A.D; SOCRANSKY, S.S. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. **J Clin Periodontol**, v.28, p. 283-295, 2001. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11314883>>. Acesso em: 18 out. 2017.

HARADA, M., et al. Functional Polymorphism in the Suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 36, n.4, p. 491-496, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17099141>>. Acesso em: 28 out. 2017.

HERMAN, J.G; BAYLIN, S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N Engl J Med**, v. 349, n.21, p.2042-2054, 2003. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14627790> >. Acesso em: 19 jul. 2017.

IACOPINO, A.M. Epigenetics: New explanations for old problems? **J Can Dent Assoc** p. 76-76, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20579452>>. Acesso em: 12 out. 2017.

IMAI, K; OKAMOTO, T. Transcriptional repression of human immunodeficiency virus type 1 by AP-4. **J Biol Chem**, v.281, p. 12495-12505, 2006. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540471>>. Acesso em: 03 set. 2017.

ISHIDA K., et al. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. **J Periodontol**, v.83, p.917-925, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22122521>>. Acesso em: 18 out. 2017.

JABBARI, K; BERNARDI, G. Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. **Gene**, v. 333, p. 143-149, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15177689>>. Acesso em: 01 ago. 2017.

JO, P., et al., CpG island methylator phenotype infers a poor disease-free survival in locally advanced rectal cancer. **Surgery**, v.151, p.484-492, 2012. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001634>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

JOHNSON, G.K; HILL, M. Cigarette smoking and the periodontal patient. **J Periodontol**. v.75, n.2, p.196-209, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15068107>>. Acesso em: 05 set. 2017.

JONES, P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nat Rev Genet**, v.13, n.7, p. 484-492, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22641018>>. Acesso em: 18 out. 2017.

KARASNEH, J.A., et al. Effect of cigarette smoking on subgingival bacteria in healthy subjects and patients with chronic periodontitis. **BMC Oral Health**, v17, n. 64, 2017. Disponível em: <<https://bmcoralhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12903-017-0359-4>>. Acesso em: 13 ago. 2017.

KINANE, D.F., et al. Periodontal Disease. **Nature Reviews/Disease Primers** (2017) article number 17038 For the Primer. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/journals/nat-rev-dis-primers/>>. Acesso em: 17 set 2017.

KINANE, D.F; HART, T.C. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.14, p.430-449, 2003. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656898> >. Acesso em: 22 out. 2017.

KREBS, D.L; HILTON, D.J. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. **J Cell Sci**, v.113, n.16, p.2813-2819, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910765>>. Acesso em: 12 out. 2017.

LAVU, V; VETTRISELVI, V; RAO, R.S. The epigenetic paradigm in periodontitis pathogenesis. **J Indian Soc Periodontol**, v.19, n.2, p.142-149, 2016. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4439621/> >. Acesso em: 09 ago. 2017.

LOD, S., et al. The influence of epigenetics in relation to oral health. **Int J Dent Hyq**, v.12,p.48-54,2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23730835>>. Acesso em: 10 set. 2017.

LOFRUMENTO, D.D., et al. Neuroprotective effects of resveratrol in an MPTP mouse model of Parkinson's-like disease: possible role of SOCS-1 in reducing pro-inflammatory responses. **Innate Immun**, v.20, p.249-260, 2014. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23764428> >. Acesso em: 14 out. 2017.

LOO, W.T., et al. Epigenetic change in E-cadherin and COX-2 to predict chronic periodontitis. **J Trans Med**, v.8,n.110,2010. Disponível em:< <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-8-110> >. Acesso em: 24 set. 2017.

LOTEM, J; SACHS, L. Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. **Oncogene**, v. 13, n.21, p.3284-3294, 2002. Disponível em:< <https://www.nature.com/articles/1205319>>. Acesso em: 18 jul. 2017.

LUGGER, K., et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**. v.398, p. 251-260, 1997. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305837>>. Acesso em: 04 ago. 2017.

MEHRAZARIN, S; ALSHAIKH, A; KANG, M.K. Molecular mechanisms of Apical Periodontitis: Emerging Role of Epigenetic Regulators. **Dent Clin North Am**. v. 6. N.1, p. 17-35, 2016. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27912817>>. Acesso em: 18 out. 2017.

_____. Molecular mechanisms of Apical Periodontitis. Emerging Role of Epigenetic Regulators. **Dent Clin Am**, v.61, p.17-35, 2017. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832519>>. Acesso em: 22 out. 2017.

MENEZES, R., et al., The potential role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis. **J Endod**, v.34, n.12, p. 1480-1484, 2008. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2719713/>>. Acesso em: 18 out. 2017.

MIYOSHI, H., et al. Methylation status of suppressor of cytokine signaling-1 gene in hepatocellular carcinoma. **J Gastroenterol**, v.39, p. 563-569, 2004. Disponível em:< <https://link.springer.com/article/10.1007/s00535-003-1343-0>>. Acesso em: 18 out. 2017.

MOHAMMAD, F; MONDAL, T; KANDURI, C. Epigenetics of imprinted long noncoding RNAs. **Epigenetics**, v.4, n.5, p. 277-286, 2009. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19617707>>. Acesso em: 18 set. 2017.

NAKAGAWA, R; NAKA, T. et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. **Immunity**, v.17, n.5, p.677-687, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433373>>. Acesso em: 13 jul. 2017.

NOCITTI, F.H., et al. Current perspective of the impact of smoking on the progression and treatment of periodontitis. **Periodontology** 2000, v. 67, p. 187-210, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25494601>>. Acesso em: 18 out. 2017.

OGINO, S; NOSHO, K; KIRKNER, G.J. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. **Gut**, v.58, p.90-96, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832519>>. Acesso em: 14 set. 2017.

OHI, T., et al. Hypermethylation of CpGs in the promoter of the COL1A1 gene in the aged periodontal ligament. **J Dent Res**, v.85, p.245-250, 2006. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/154405910608500308?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed>. Acesso em: 18 out. 2017.

OKANO, et al. DNA methyltransferases DNMT3a and DNMT3b are essential for the novo methylation and mammalian development. **Cell**, v.99, p.247-257, 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555141>>. Acesso em: 26 set. 2017.

OLIVEIRA, N.F.P., et al. TLR2 and TLR4 gene promoter methylation status during chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.38, n.11, p.975-983, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21899586>>. Acesso em: 15 set. 2017.

_____. et al. DNA methylation status of the IL8 gene promoter in oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.36, n.9, p.719-725, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19659670> >. Acesso em: 21 out. 2017.

OLERUP O & ZETTERQUIST H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, V. 39, 225-235.1992.

PAGE, R.C; KORNMAN, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 9-11, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9567963>>. Acesso em: 21 out. 2017.

PARRA, F.C., et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v, 100, n.1, p.177-182, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC140919/>>. Acesso em: 13 set. 2017.

PORTELA, A; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol**, v.28, n.10, p. 1057-1068, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944598>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

_____. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol**, v.28, p. 1057-1068, 2010. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nbt.1685> >. Acesso em: 18 out. 2017.

PROBST, A.V; DUNLEAVY, E; ALMOUZNI, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. **Nature Reviews Molecular and Cell Biology**, v. 10, p. 192-206, 2009. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234478>>. Acesso em: 22 out. 2017.

RAMIREZ-CARROZZI, V.R., et al. A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. **Cell**, v.138, n.1, p. 114-128, 2009. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19596239>>. Acesso em: 19 jul. 2017.

RASTMANESH, M.M., et al. Increased expression of SOCS3 in monocytes and SOCS1 in lymphocytes 31 correlates with progressive loss of renal function and cardiovascular risk factors in chronic kidney disease. **Eur J Pharmacol**, v.28, n.593, p.:99-104, 2008. Disponível em:< <http://europepmc.org/abstract/med/18656467>>. Acesso em: 14 out. 2017.

_____. et al. Increased SOCS expression in peripheral blood mononuclear cells of end stage renal disease patients is related to inflammation and dialysis modality. **Eur J Pharmacol**, v.5, n.602 (1), p.163-167, 2009. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19041303> >. Acesso em: 14 out. 2017.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v.447, n. 24, p. 425-432, 2007. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522676>>. Acesso em: 04 set. 2017.

REIK, W; SANTOS, F; DEAN, W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. **Theriogenology**, v 59 (1): p.21-32, 2003. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499015>>. Acesso em: 18 out. 2017.

REYNOLDS, M.A. Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease. **Periodontology** 2000, v.64, p.7-19, 2014. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832519>>. Acesso em: 13 ago. 2017.

RUSSO, V.E.A.; MARTUENSSEN, R.A.; RIGGS, A.D. (eds) **Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, v.32 1996. Disponível em: <<https://cshmonographs.org/index.php/monographs/issue/view/087969490.32>>. Acesso em: 28 set. 2017.

SAELEE, P., et al. Hypermethylation of suppressor of cytokine signaling 1 in hepatocellular carcinoma patients. **Asian Pac J**, v.13, p.3489-3493, 2012. Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/230893351_Hypermethylation_of_Suppressor_of_Cytokine_Signaling_1_in_Hepatocellular_Carcinoma_Patients>. Acesso em: 30 set. 2017.

SAXONOV, S., et al. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n.5, p.1412-1417, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16432200>>. Acesso em: 12 out. 2017.

SEO, J.Y., et al. Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. **Restor Dent Endod**, v.40, n.1, p.14-22, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25671208>>. Acesso em: 18 set. 2017.

SIMONT, C.N; CAPRA, J.A. The evolution of the human genome. *Curr Opin Gent Dev.* v. 35, p. 9-15, dec, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26338498>>. Acesso em: 16 set. 2017.

SHARMA, S., et al. Epigenetic in cancer. **Carcinogenesis**.v.31, p. 27-36, 2010. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19752007>>. Acesso em: 18 jun. 2017.

SOBTI, R.C., et al., Aberrant promoter methylation and loss of suppressor of cytokine signaling-1 gene expression in the development of uterine cervical carcinogenesis. **Cell. Oncol**, v34, p.533-543, 2011. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13402-011-0056-2>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

SOMA, T., et al. Nicotine induces the fragile histidine triad methylation in human esophageal squamous epithelial cells. **Int J Cancer**, v.119n.5p.1023-1027, 2006. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16570269>>. Acesso em: 18 out. 2017.

SOUZA, J.A., et al. Expression of supressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. **Arch Oral Biol**, v.56, p.1120-1128, 2011. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21511249>>. Acesso em: 12 jul. 2017.

STARR, R; HILTON, D.J. SOCS: suppressors of cytokine signalling. **Int J Biochem Cell Biol**, v.30, n.10, p.1081-1085, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9785473> >. Acesso em: 07 jun. 2017.

STEFANI, F.A., et al. Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues. **Immunobiology**, v, 218p.1012-1017, 2013. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23332218>>. Acesso em: 18 out. 2017.

STEVINKEL, P., et al. Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation-a novel risk factor for cardiovascular disease? **J Intern Med**, v, 261, p. 488-499, 2007. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17444888>>. Acesso em: 28 ago. 2017.

TABA, J.R. et al. Periodontal disease: a genetic perspective. **Braz Oral Res.**, v.26, p.32-8, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242012000700006 >. Acesso em: 15 set. 2017.

TONETTI, M.S. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. **Ann Periodontol**, v.3n.1p.88-101.1998. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9722693> >. Acesso em: 15 set. 2017.

TREVILATTO PC & LINE SR. (2000) Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. **Journal of Forensic Odonto-Stomatology**, V. 18, 6-9.

VIANA, M.B., et al. Methylation pattern of IFN-8 and IL-10 genes in periodontal tissues. **Immunobiology**, v, 216, p.936-941, 2011. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/21281983>>. Acesso em: 13 set. 2017.

WADE, A.P. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. **Bioessays**, v. 23, n.12, p.1131-1137, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11746232>>. Acesso em: 06 out. 2017.

WAGGONER, D. Mechanisms of disease: epigenesis. **Semin Pediatric Neural**. v.14, n..3, p. 7-14, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17331879>>. Acesso em: 18 jun. 2017

WAN, E.S., et al. cigarette smocking behaviors and time since quitting are associated with differential DNA methylation across the human genome. **Hum Mol Genet**, v.21, n.13, p.3073-3082, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22492999> >. Acesso em: 21 out. 2017.

WANG, Z.; SCHONES, D.E; ZHAO, K. Characterization of human epigenomes. **Curr Opin Genet Dev**, v.19, n.2, p.127-134, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19299119>>. Acesso em: 23 jul. 2017.

WARREN, S.A; DOUGLAS J.H. The role of supressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. **Annual Review of Immunology**, v.22, n.1, p.503-529, 2004. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.22.091003.090312?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.882003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=immunol>. Acesso em: 03 out. 2017.

WEBER, A., et al. SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. **Oncogen**, v.24, p. 6699-6708, 2005. Victoria. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007169>>. Acesso em: 10 out. 2017.

WILLIAMS, S.D., et al. Epigenetics: a new frontier in dentistry. **Aust Dent J**, v.59, p.23-33, 2014. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24611746>>. Acesso em: 10 set. 2017.

XIE, S. et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. **Gene**, v. 236, n.1, p.87-95, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10433969>>. Acesso em: 18 jun. 2017.

YANG, T., et al. SOCS-1 protects against Chlamydia pneumonia-induced lethal inflammation but hampers effective bacterial clearance. **J Immunol**, v.180, n.6, p.4040-4049, 2008. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/180/6/4040.long>>. Acesso em: 18 jun. 2017.

YOSHIKAWA, H., et al. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. **Nat Genet**, v.28, n.1, p.29-35, 2001. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11326271>>. Acesso em: 09 ago. 2017.

YOSHIMURA, A., et al. Secretion of IL-1b, TNF-a, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. **J Periodontal Res**, v. 32, n.3, p.279-286, 1997. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.16000765.1997.tb00535.x/abstract>>. Acesso em: 02 out. 2017.

ZHANG, S., et al. Alteration of PTGS2 promoter methylation in chronic periodontitis. **J Dent Res**, v.89, p.133-237, 2010. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034509356512>>. Acesso em: 10 jul. 2017.

_____. Epigenetic regulation of TNFA expression in periodontal disease. **J Periodontol**, v.84, p.1606-1616. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23368949>>. Acesso em: 20 jul. 2017.

_____. Interferon-gamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.37, p. 953-961. 2010. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20958339>>. Acesso em: 14 out. 2017.

ZYMO RESEARCH (North America). Catálogo. **Instruction Manual: EZ DNA Methylation-Gold™ Kit Catalog Nos. D5005 & D5006**. 2017. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832519>>. Acesso em: 28 ago. 2017.

ZOU, G. A Modified Poisson Regression Approach to Prospective Studies with Binary Data. **Am J Epidemiol**, v.159, n.7, p.702-706, 2004. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15033648>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

Apêndice

APENDICE A – TCLE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nós, Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Junior e o Mestrando Cristhiam de Jesus Hernández Martínez, convidamos você, _____, a participar da pesquisa **“Efeito do tabagismo no perfil de metilação de DNA no promotor do gene SOCS 1 em células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos fumantes e não fumantes portadores de periodontite crônica.”** Esta pesquisa vai avaliar o que o cigarro faz na gengiva de pacientes com periodontite crônica fumantes e comparar com quem não fuma. Será realizada a limpeza dos dentes, bem como a coleta de células da boca a partir de bochechos com dextrose a 3% (água com açúcar). Se necessário serão feitos raspagem e alisamento dos dentes e anestesia. Os riscos da pesquisa são mínimos, tendo em vista que será somente coletado um bochecho. Resume-se ao desconforto de participar da pesquisa fazendo o bochecho. Os benefícios é que todos vocês, os participantes da pesquisa, terão tratamento periodontal completo e de suporte. Os riscos do tratamento que podem existir são os mesmos riscos que as pessoas que se submetem ao tratamento dos dentes e das gengivas e que necessitem de anestesia. Todos os dados relacionados com você serão confidenciais e sua identidade será mantida em sigilo. A divulgação dos resultados será realizada, preservando a sua identidade, todos vocês serão identificados por um número ou, apenas por suas iniciais, não tendo seus nomes ou dados que lhe possa identificar revelados.

Rubrica do pesquisador responsável

Rubrica do participante

Você terá total liberdade para pedir maiores esclarecimentos antes e durante o desenvolvimento da pesquisa. Se tiver alguma dúvida poderá ligar para o pesquisador para pedir qualquer informação (Cristhian de Jesus Hernandez Martinez – Avenida do Café S/N – Departamento de Periodontia – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Tel: (16) 3315.3979. Suas reclamações e/ou insatisfações relacionadas à sua participação na pesquisa poderão ser comunicadas por escrito à secretaria do CEP/FORP/USP (16) 3315-0493 - Horário de atendimento das 8h às 12h, de segunda a sexta-feira, devendo conter seu nome que será mantido em sigilo. A sua participação não é obrigatória, e você poderá desistir a qualquer momento, retirando sua autorização. A não autorização deste trabalho não trará nenhum prejuízo a você, bem como a sua relação com o pesquisador ou com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Você receberá uma via deste termo.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Eu _____, portador do RG _____
_____, CPF _____, residente a _____
_____, número _____, na cidade de _____ no Estado _____,
Telefone _____. Declaro que li compreendi e concordo com o
presente Termo, por isso assino este documento de livre e espontânea vontade.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do participante da pesquisa

Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Junior
Av do Café S/N CEP: 140409-04 Ribeirão Preto, SP - Brasil. Departamento CBTMF e
Periodontia Faculdade De Odontologia de Ribeirão Preto.
(16) 33154092

APENDICE B - FICHA DE COLETA DE DADOS

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP

N ☐ 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 ()

Quantos cigarros por dia? _____ (mínimo 10)

Há quanto tempo fuma? _____

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

Anexo

ANEXO A - PROCESSO CAAE 57171816.2.0000.5419

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Efeito do tabagismo no perfil de metilação de DNA no promotor do gene SOCS 1 em células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos fumantes e não fumantes portadores de periodontite crônica.

Pesquisador: ARTHUR BELEM NOVAES JÚNIOR

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 57171816.2.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.109.107

Apresentação do Projeto:

Emenda onde os pesquisadores solicitam um período de 6 meses a mais no cronograma do projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Emenda.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Emenda.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda .

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br

Continuação do Parecer: 3.189.187

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado. Conforme deliberado na 204ª Reunião do CEP/FORP/USP, em 07/06/2017.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_858917_E1.pdf	13/04/2017 14:45:18		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.docx	13/04/2017 14:36:47	ARTHUR BELEM NOVAES JÚNIOR	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	02/06/2016 00:14:45	ARTHUR BELEM NOVAES JÚNIOR	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	20/05/2016 17:46:07	ARTHUR BELEM NOVAES JÚNIOR	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_da_instituicao_e_infraestrutura.pdf	27/04/2016 13:41:35	ARTHUR BELEM NOVAES JÚNIOR	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 08 de Junho de 2017

Assinado por:
Simone Cecílio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP
FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa Efeito do tabagismo no perfil de metilação de DNA no promotor do gene SOCS 1 em células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos fumantes e não fumantes portadores de periodontite crônica.			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 60			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4: Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: ARTHUR BELEM NOVAES JÚNIOR			
6. CPF: 932.313.698-00		7. Endereço (Rua, n.º): MARQUES DE VALENÇA ALTO DA BOA VISTA 389 RIBEIRÃO PRETO SÃO PAULO 14025490	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO		9. Telefone: (16) 3315-3980	10. Outro Telefone:
11. Email: novaesjr@fop.usp.br			
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumpro os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: <u>28</u> / <u>05</u> / <u>2016</u>
Assinatura			
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: Universidade de São Paulo		13. CNPJ: 03.025.530/0006-01	14. Unidade/Orgão:
15. Telefone: (16) 3602-4102		16. Outro Telefone:	
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumpro os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: <u>LEA ASSED B. DA SILVA</u>		CPF: <u>741.906.018-53</u>	
Cargo/Função: <u>DIRETORA</u>			
Data: <u>25</u> / <u>05</u> / <u>2016</u>
Assinatura			
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			

ClinicalTrials.gov PRS
Protocol Registration and Results System

ClinicalTrials.gov PRS DRAFT Receipt (Working Version)
Last Update: 12/11/2017 20:02

ClinicalTrials.gov ID: NCT03371446

Study Identification

Unique Protocol ID: CAAE: 57171816.2.0000.5419

Brief Title: DNA Methylation Profile of the SOCS-1 Gene Promoter in Smokers Patients With Chronic Periodontitis.

Official Title: Effect of Smoking on the DNA Methylation Profile of the SOCS 1 Gene Promoter in Oral Mucosal Epithelial Cells of Individuals With Chronic Periodontitis (Smokers and Nonsmokers).

ANEXO B - QUANTIFICAÇÃO DO DNA NAS AMOSTRAS

Quantificação de DNA em saliva.

Amostra	Concentração	A 260/280	A 260/230
01 A PF	129.5	1.95	1.36
02 A PF	89.4	1.92	1.14
03 A PF	124.7	1.99	1.97
04 A PF	357.0	2.01	1.56
05 A PF	597.6	1.92	1.51
06 A PF	2375.9	1.91	1.52
07 A PF	392.9	1.86	1.21
08 A PF	269.6	1.97	1.68
09 A PF	281.8	2.01	1.72
10 A PF	919.4	1.85	1.41
11 A PF	636.4	1.99	1.56
12 A PF	198.4	1.98	1.60
13 A PF	270.4	1.86	1.28
14 A PF	121.3	1.93	1.62
15 A PF	540.5	2.04	1.69
16 A PF	164.1	2.01	1.47
17 A PF	200.3	1.90	1.83
18 A PF	784.5	1.86	1.48
19 A PF	327.0	1.98	1.61
20 A PF	380.3	1.75	1.07
21 A PF	710.4	1.92	1.95
22 A PF	206.4	1.89	1.70
23 A PF	544.5	1.79	1.17
24 A PF	183.1	1.90	1.50
25 A PF	214.7	1.96	1.37
26 A PF	89.5	1.99	1.40
27 A PF	531.0	1.80	1.24
28 A PF	587.6	1.98	1.71
29 A PF	217.3	1.95	1.64
30 A PF	147.8	1.95	1.82

Amostra	Concentração	A 260/280	A 260/230
01 A PNF	287.4	1.98	1.77
02 A PNF	198	1.83	1.29
03 A PNF	340.9	1.98	1.69
04 A PNF	1273.4	2.05	1.99
05 A PNF	164.9	1.98	1.84
06 A PNF	62.2	1.89	1.65
07 A PNF	841.9	1.97	1.80
08 A PNF	414.5	1.86	1.42
09 A PNF	257.7	2.2	0.97
10 A PNF	931.6	1.89	1.41
11 A PNF	2699.4	1.98	1.39
12 A PNF	702.8	1.87	1.59
13 A PNF	163.7	2.01	1.90
14 A PNF	217.1	1.83	1.15
15 A PNF	373.1	1.99	1.48
16 A PNF	287.4	1.92	1.79
17 A PNF	735.2	2.01	1.52
18 A PNF	784.5	1.86	1.48
19 A PNF	379.6	1.83	1.02
20 A PNF	291.9	1.78	0.96
21 A PNF	1,449.9	2.09	1.74
22 A PNF	395.4	1.99	1.54
23 A PNF	630.0	1.79	1.06
24 A PNF	361.9	1.98	1.53
25 A PNF	210.2	2.00	1.87
26 A PNF	770.4	1.80	1.02
27 A PNF	183.0	1.95	1.63
28 A PNF	502.3	1.93	1.34
29 A PNF	240.3	1.82	0.96
30 A PNF	305.8	1.95	1.75

ANEXO C ESTUDO DE ARTIGOS PARA SELEÇÃO DE PRIMERS

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
Fonte	Amplific Primer	Sequência (5'-3')	RevCompl	SeqOrig (sense)	Primer p/ BLAST	Primer p/ BLAST	BLAST nt	Hairpin Dimer	%GC	CrossDimer (CrossDii Tm				
Yoshikawa et al., 201	160 MIF	TTGCGGTGATTTTTAGGTGGTC		TCGCGGTGCACATTTTCAAGCCGGCC	TCGCGGTGCACATTTTCAAGCCGGCC	TCGCGGTGCACATTTTCAAGCCGGCC	OK	24	X	45.8	-10.6		7	64.7
	MIR	CGACACAACCTCTACACGACCC	CGGTCTGTTAGGAGTTGT	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG		23		86.5				64.3
	175 UIF	TTATGAGTATTGTGTGTAATTTTAGTTGGTT		CCACGAGCATCCGCGTGCACATTTTCAI	CCACGAGCATCCGCGTGCACATTTTCAI	CCACGAGCATCCGCGTGCACATTTTCAI	OK	33		27.3	-9.31		16	64.6
	UIR	CACATAACAACACACTCTCTACAT	TGGTTGTTAGGAGTTGT	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG		29		41.4				66.1
Miyoshi et al., 2004	165 Exon-MF	GAGTATTCGGGTGATTTTTTAGG		GAGCATCCGCGTGCACATTTTCAAG	GAGCATCCGCGTGCACATTTTCAAG	GAGCATCCGCGTGCACATTTTCAAG	OK	23	X	39.1	-6.63		5	66.4
	Exon-MIR	CGACACAACCTCTACACGACCC	CGGTCTGTTAGGAGTTGT	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG		23		63.7				64.3
	166 Exon-UF	TGAGTATTGTGTGTAATTTTAGG		CGAGCATCCGCGTGCACATTTTCAAG	CGAGCATCCGCGTGCACATTTTCAAG	CGAGCATCCGCGTGCACATTTTCAAG	OK	24		43.7	-8.54		7	62.2
	Exon-UIR	CAACACAACCTCTACACAACCC	TGGTTGTTAGGAGTTGT	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG		23		43.5				57.8
	139 5UTR-MF	GTTCCGTTTCGTTAGTTTTCGAGG		GCCCGGCCCGCCAGTTTTCGAGG	GCCCGGCCCGCCAGTTTTCGAGG	GCCCGGCCCGCCAGTTTTCGAGG	OK	25	X	44.0	-9.6		4	64.9
	5UTR-MIR	ACCCGACCGACCGGATCTC	GGATCGCGTGGTGGG	GAGACCGCGCGCGCGGGGC	GAGACCGCGCGCGCGGGGC	GAGACCGCGCGCGCGGGGC		21		71.4				71.9
	139 5UTR-UF	GTTTGGTTTGTAGTTTTCGAGG		GCCCGGCCCGCCAGTTTTCGAGG	GCCCGGCCCGCCAGTTTTCGAGG	GCCCGGCCCGCCAGTTTTCGAGG	OK	25		32.0	-10.25		5	69.2
	5UTR-UIR	ACCCACAACCAACCAATCTC	GGATTTGTGGTTGGG	GAGACCGCGCGCGCGGGGC	GAGACCGCGCGCGCGGGGC	GAGACCGCGCGCGCGGGGC		21		62.4				60.8
Weber et al., 2005	184 M2F	TGAAGATGGTTTCGGGATTACGA		TGAAGATGGCTTCGGGACCCACGA	TGAAGATGGCTTCGGGACCCACGA	TGAAGATGGCTTCGGGACCCACGA	OK	24	X	41.7	não tem			64.8
	M2R	ACAACCTCTACACGACCGCAC	CGTCCGCTGTTGTAGGA	CGTGGCGGCTGCAGGAGCTGT	CGTGGCGGCTGCAGGAGCTGT	CGTGGCGGCTGCAGGAGCTGT		23		86.5				66.1
	183 U2F	TGAAGATGGTTTGGGATTATGA		TGAAGATGGCTTCGGGACCCACGA	TGAAGATGGCTTCGGGACCCACGA	TGAAGATGGCTTCGGGACCCACGA	OK	24		33.3	-8.31		1	60.7
	U2R	CACAACCTCTACACAACCAAC	GTGTGTGGTTGTTGTAGGA	GGTGGCGGCTGCAGGAGCTGTG	GGTGGCGGCTGCAGGAGCTGTG	GGTGGCGGCTGCAGGAGCTGTG		25		48.0				61.2
Cheng et al., 2014	160 M3F	TTGCGGTGATTTTTAGGTGGTC		TCGCGGTGCACATTTTCAAGCCGGCC	TCGCGGTGCACATTTTCAAGCCGGCC	TCGCGGTGCACATTTTCAAGCCGGCC	OK	24	X	45.8	-10.6		7	64.7
	M3R	CGACACAACCTCTACACGACCC	CGGTCTGTTAGGAGTTGT	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG		23		86.5				64.3
	169 U3F	TTATGAGTATTGTGTGTAATTTTAGTTGGTT		CCACGAGCATCCGCGTGCACATTTTCAI	CCACGAGCATCCGCGTGCACATTTTCAI	CCACGAGCATCCGCGTGCACATTTTCAI	OK	24		20.8	-8.54		5	49.7
	U3R	CGACACAACCTCTACACGACCC	CGGTCTGTTAGGAGTTGT	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG	CGGCGGCTGCAGGAGCTGTGCCG		23		66.5				64.3

ANEXO E - PERIOGRAMA PACIENTE FUMANTE