

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARINELE RIBEIRO DE CAMPOS

**ANÁLISE POR MICROARRAY DA EXPRESSÃO GENÉTICA
DE MECANISMOS RELACIONADOS À APOPTOSE,
RESPOSTA DE CÉLULAS T E INFLAMAÇÃO EM SÍTIOS
COM E SEM PERIODONTITE**

BAURU
2007

MARINELE RIBEIRO DE CAMPOS

ANÁLISE POR MICROARRAY DA EXPRESSÃO GENÉTICA DE MECANISMOS
RELACIONADOS À APOPTOSE, RESPOSTA DE CÉLULAS T E INFLAMAÇÃO EM
SÍTIOS COM E SEM PERIODONTITE

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação da
Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de DOUTOR em
Odontologia, área de concentração Reabilitação Oral

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira do Santos

Co-Orientador: Dr. Homayoun Hossein Zadeh

BAURU
2007

C157a Campos, Marinele Ribeiro de
Análise por *Microarray* da expressão genética de mecanismos relacionados à apoptose, resposta de células T e inflamação em sítios com e sem periodontite / Marinele Ribeiro de Campos. -- Bauru, 2007.
xxx 140 p. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data: _____ / _____ / _____ .

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da University of Southern California
Número do protocolo: HS-0344003

Bom mesmo é ir à luta com determinação. Abraçar a vida e viver com paixão. Perder com classe e vencer com ousadia. O mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese à pessoa mais inspiradora do mundo.
Meu maior exemplo de honestidade, dignidade, humildade e luta:
Meu Pai.

AGRADECIMENTOS

A QUATRO PESSOAS REALMENTE INPIRADORAS:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos. Conviver com você desde o meu mestrado foi uma experiência realmente engrandecedora. Sua competência, garra, determinação e profissionalismo são inspiradores. Muito do meu sucesso nos Estados Unidos devo ao tempo em que tive a oportunidade maravilhosa de passar no seu laboratório. Levarei memórias pra sempre no meu coração.

My friend and mentor, Dr. Homayoun Zadeh. You have inspired me, since the first day we met, in 2004. Without you, I wouldn't be able to accomplish my dream. I am very grateful and happy to have you by my side. You are an extraordinary human being, friend, mentor, and scientist. The way you deal with life and negative situations have been a wonderful inspiration. Words are not enough to thank you. I will never forget you.

Ao querido Prof. Dr. Euloir Passanezi, ou simplesmente meu “tio Loi”. Suas qualidades como ser-humano conheço desde o dia em que nasci. Ao entrar na Faculdade de Odontologia minha admiração por você cresceu, pois percebi que profissional e professor exemplares você é. Tenho muito orgulho de ser sua sobrinha. Palavras nunca serão suficientes pra agradecer.

À minha prima-irmã, Profa. Dra. Adriana Sant'ana. Desde que nasci você tem sido uma inspiração e uma pessoa muito importante na minha vida. Sua presença ao meu lado em todos os momentos tem sido um bálsamo no meu coração. Muito obrigada minha querida prima, por toda confiança e apoio, e principalmente pela torcida e vibração com as minhas conquistas.

Vocês são pessoas realmente iluminadas e tenho orgulho em chamá-los de “Mestres”.

AGRADEÇO:

A Deus, que me agraciou com o dom da vida, e me deu mais uma oportunidade de evoluir em direção ao caminho da luz. Obrigada senhor, pelos momentos de felicidade, verdade e também de dor, pois pude perceber a grandeza de sua misericórdia e me tornar um ser humano melhor.

À Capes, pelo suporte financeiro, que me permitiu a realização de um grande sonho: *ser professora.*

Aos funcionários da Pós-graduação da FOB-USP, especialmente Letícia e Giane, por toda ajuda dispensada durante os 4 anos de curso.

Aos funcionários dos Departamentos de Prótese e Ciências Biológicas (Disciplina de Fisiologia), especialmente Débora e Edna, pela torcida e incentivo.

Ao Thiago José Dionísio, pelo exemplo de profissionalismo e respeito ao próximo. Obrigada por toda ajuda, paciência e por todo conhecimento repartido.

Ao pessoal da Periodontia, meu departamento do coração: Ivânia, Edilaine e Marcão. Conviver com vocês por todos esses anos foi maravilhoso.

Ao professor Dr. Jorgensen e aos funcionários Vick, Wendy e Zach Willians da USC, que fizeram a diferença no primeiro ano em que vivi nos Estados Unidos. Muito obrigada por tudo.

Aos meus colegas do Doutorado da Reabilitação Oral: Ana Lúcia Almeida, Eduardo Ayubi, Jeffinho, Leilha, Luís Gustavo, Marli, Paulo Fukashi, Paulão, Rafael, Renato, Ricardo Faustão e Tatyane. Obrigada pelos 4 anos de trocas de conhecimentos científicos e de vida. Especialmente a vocês Ana Lúcia e Marli, que iniciaram comigo uma experiência inovadora. Obrigada pelo carinho, respeito e incentivo à minha carreira docente.

Aos demais colegas da Reabilitação Oral: Ana Paula, Dudu, Fernando Freitas, Kátia, Lívia, Patrícia Calderon, Paola, Romão, Thiago Pegoraro e Valéria.

Às minhas amigas e companheiras de experiências e momentos inesquecíveis na Farmacologia, Thais Marchini e Ana Eliza Akashi.

À Professora Maria Lúcia Rubo de Rezende, que hoje considero minha amiga “Malu”. Seus conselhos pessoais e profissionais levarei no meu coração. Você é uma pessoa muito especial, além de uma excelente profissional. Espero manter contato com você para sempre.

Ao Professor Flávio Augusto Cardoso de Faria, pela ajuda e compreensão num momento tão difícil. Sua maneira de ser professor é realmente uma inspiração.

Ao Professor Dr. Sebastião Luiz Aguiar Gregghi. Desde o dia que cheguei na FOB, você sempre se mostrou solícito e companheiro. Muito obrigada por todo apoio e conhecimento.

Ao Professor Valdyr Janson. Existem pessoas que nascem para serem verdadeiros Mestres. Segurei seu exemplo de como “Ser professor” para toda a vida.

Aos Professores e funcionários da Prótese, especialmente aos Professores Accácio e Carlos Araújo.

Ao Prof. Pegoraro: um exemplo de ser humano, professor e amigo. Levarei seus ensinamentos para sempre sempre no meu coração.

Ao Prof. Conti, pelo carinho, amizade, força, mas principalmente por ter acreditado em mim.

Ao meus colegas Amir e Jeremy, pelo apoio e companherismo tão importantes na realização dessa pesquisa.

Aos amigos dos Estados Unidos Luciana, Antônia, Miriam, Nickolay, Flávia, Brian e Manuela. Obrigada por tantos momentos agradáveis.

Ao Dr. You, pelos momentos de amizade, carinho e diversão.

Ao Dr. Kook, sua humildade é realmente cativante, tenho orgulho em poder dividir experiências com você.

Ao meu amigo Marcelo Freire, que sempre esteve ao meu lado, e com quem dividi momentos de alegria e dor. Você por muitas vezes tornou meu caminho mais fácil. Obrigada pela ajuda na realização dessa pesquisa.

Aos meus inesquecíveis amigos que conheci em Bauru: Elonice, Patrícia Leite, Gabriela, Flora, Juliana baiana, Angélica, Safira, Paty Andrade, Janaina Ghizoni, Marcus Gustavo, Ingrid, Carol Morandini e Cynthia Nóbrega. Levarei vocês para sempre no meu coração.

Às minhas queridas irmãs de coração e alma: Isabel, Neddinha, Polyana e Priscila Nóbrega. Sei que nossos laços de amizade superarão a distância e até mesmo o tempo.

Às minhas novas e tão especiais amigas: Layla, Roberta, Ludmila e Adaiana. Vocês foram minha força por muito tempo. Muito obrigada tantos momentos alegres e por toda a torcida. Nunca me esquecerei de vocês.

Às minhas queridas e eternas *roommates* Fabiana e Soraia. Obrigada pela família tão especial que tivemos em uma das épocas mais felizes da minha vida.

Ao Fábio, minha eterna dupla. Nunca me esquecerei de toda amizade, carinho e respeito que sempre tivemos um ao outro. Sei que nem o tempo apagará.

À minha família americana Cíntia, Marcelo Moreira, Paulinho e Vlad. Só quem vive longe daqueles que ama, sabe a importância da verdadeira amizade. Agradeço a Deus por ter colocado na minha vida pessoas tão especiais como vocês. Espero que nossa amizade seja eterna. Muito obrigada por tudo.

À minha querida amiga Zezé que esteve comigo nos momentos mais difíceis da minha vida e que acreditou em mim, quando eu mesma não cosegui. Você é um exemplo de dignidade, amizade e profissionalismo.

À minha querida família:

À minha futura prima Carla, por todo carinho, torcida e incentivo.

Aos meus queridos primos Danielle e Ricardo, pela amizade, torcida e confiança.

Ao meu querido primo-irmão Gustavo. Você é o irmão que não tive. Muito obrigada por tudo. Por muitas vezes você foi a minha força e minha razão. Nunca me esquecerei das nossas conversas noturnas.

Aos meus avós paternos Aguinaldo e Elza, o meu eterno carinho. Levarei vocês para sempre na minha memória.

Aos primos Adriana, Eduardo, João e Gabriela. A alegria e o carinho de vocês foi por muitas vezes minha esperança de um futuro melhor.

Aos meus queridos tios Selma e Euloir. Não tenho palavras que expressem fielmente toda gratidão, carinho e respeito que sinto por vocês. Tenho muito orgulho de dizer que vocês foram pra mim, verdadeiros pais. Essa conquista também é de vocês.

Aos meus queridos avós José e Serafina. O amor que sinto por vocês é tão imenso que não conseguiria expressar. Suas palavras de amor e seus ensinamentos me fizeram um ser humano melhor.

À minha querida irmã Mirella. Tenho muito orgulho de ser sua irmã. Você é uma pessoa muito especial. Obrigada por tudo. Suas conquistas são minhas também

Ao meu namorado Demian. Hoje sei que nosso encontro estava escrito, e que o universo conspirou a nosso favor. Você é uma pessoa tão especial, que muitas

vezes me emociona. Esperei-te por toda a minha vida. Desejo do fundo do meu coração que a gente caminhe juntos pra sempre. Muito obrigada por todo amor, carinho e apoio tão essenciais na realização desta tese.

Aos meus pais, meus maiores exemplos. Vocês são pessoas tão especiais, que agradeço a Deus todo o dia por ter nascido nessa família. O que mais me deixa feliz com minhas conquistas é ver o orgulho que sentem por mim. Todas as conquistas que tive e que ainda terei dedico a vocês.

Este trabalho de pesquisa foi realizado no ***Department of Diagnostic Science, Dental School of University of Southern California, Los Angeles, Califórnia***, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, com colaboração do orientador estrangeiro Dr. Homayoun Hossein Zadeh.

RESUMO

RESUMO

Acridita-se que a placa dento-bacteriana seja primordial na iniciação do processo de inflamação periodontal. Entretanto, os mecanismos exatos responsáveis pela progressão da doença periodontal ainda não foram completamente elucidados. Além disso, as bases biológicas que ditam a susceptibilidade do hospedeiro ainda permanecem desconhecidas. Portanto, o presente estudo procurou investigar diferenças na expressão gênica de sítios com periodontite. Para tanto, foi utilizada a tecnologia de microarray focado para examinar a expressão de 288 genes relacionados à apoptose, resposta de células T e inflamação. RNA total foi extraído de amostras de tecido gengival e sangue de indivíduos com periodontite crônica (N=10) e de indivíduos periodontalmente saudáveis (N=4). RNA total foi então convertido em cRNA, marcado e hibridizado em lâminas de microarray. Após a exposição, os genes marcados foram quantificados e o nível de expressão genética nas amostras gengivais dos pacientes periodontais foi comparado com o nível de expressão observado no sangue desses mesmos indivíduos, e também com o nível da expressão genética no tecido gengival dos indivíduos sem doença periodontal. Para validação dos resultados dos genes selecionados ($p \leq 0,05$ e no mínimo mudança de 2 vezes na expressão) foram submetidos à análise pela técnica de PCR em tempo real. O valor de p das comparações foi calculado por meio do teste t bicaudal. Os dados do microarray, confirmados por PCR em tempo real, demonstraram um total de 8 genes com baixa expressão ($\log_2 \leq -1$ e $p \leq 0,05$) e 4 genes com elevada expressão ($\log_2 < +1$ e $p \leq 0,05$). Entre eles foram detectados 4 genes anti-apoptose (BCL-2, BCL2L1, BAG3 e BAFAR), 2 receptores de citocinas (IL12RB1 e IL17RA), receptor de proteína G (GPR44) e o fator nuclear de células T ativadas (NFATC1). Adicionalmente, os resultados demonstraram 3 genes com expressão elevada, uma citocina (IL-6), uma quimiocina (IL-8) e um membro da família FOS (FOSL-1). As análises da expressão genética por microarray e PCR em tempo real realizadas no presente estudo identificaram uma série de genes candidatos que podem estar relacionados à doença periodontal. A desregulação da expressão desses genes pode contribuir para a severidade desta doença.

Palavras-chave: Doença periodontal. Microarray. Apoptose. Inflamação. Células T

ABSTRACT

ABSTRACT

“Microarray analysis of gene expression in the inflammatory T cell response and apoptosis pathways of periodontitis and non-periodontitis sites”.

It is widely believed that pathogenic bacteria provide the initial trigger in periodontal disease. However, the exact pathogenic mechanisms responsible for the progression of periodontal disease remain unclear. Moreover, the biologic basis dictating the susceptibility to disease has not been elucidated. Therefore, the present study sought to investigate the expression of genes altered in periodontal disease sites. To that aim, a focused microarray system was utilized to examine the expression of 288 genes related to apoptosis, T cell response and inflammation. Total RNA was extracted from gingival tissue and peripheral blood of periodontitis (N=10) and non-periodontitis (N=4) subjects. The RNA was converted to cRNA, labeled and hybridized to oligonucleotide microarray plates. Following exposure, the positively labeled genes were quantified and the level of expression within periodontitis gingiva was compared to the PB of the same subjects, as well as with GT of NP subjects. To validate the results the selected genes ($p \leq 0.05$ and at least 2 fold change) were subjected to real-time PCR. The p -value of the comparisons was calculated using a 2-tailed T-test. The microarray results and real-time PCR validation showed that 8 genes were downregulated ($p < 0.05$ and $\log_2 \leq -1$). Among these, 4 anti-apoptotic genes (BCL-2, BCL2L1, BAG3 and BAFAR), 2 cytokine receptors (IL12RB1 and IL17RA), a G-protein-coupled receptors (GPR44) and a nuclear factor of activated T cells (NFATC1) were detected. In addition, the results showed 3 upregulated genes ($p < 0.05$ and $\log_2 \leq +1$), one cytokine (IL-6), one chemokine (IL-8) and one FOS family member (FOSL1). The combined use of oligonucleotide microarrays and real-time PCR identified a number of candidate genes that can be related to the pathogenesis of periodontal disease, and dysregulation in the expression of these genes may contribute to the progression of periodontal disease.

Key words: Periodontal disease. Microarray. Apoptosis. Inflammation. T cell.

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------|--------------|
| RESUMO | XXIII |
| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 3 |
| 2 PROPOSIÇÃO | 25 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 4 RESULTADOS | 49 |
| 5 DISCUSSÃO | 83 |
| 6 CONCLUSÃO | 93 |
| 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 97 |

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A doença periodontal compreende um grupo de lesões de natureza infecto-inflamatória que afeta os tecidos periodontais de proteção (gengiva), denominando-se gengivite, e de suporte (cimento, osso alveolar e ligamento periodontal), denominando-se periodontite.

As lesões periodontais são altamente prevalentes (LOE; SILNESS, 1963, VAN DYKE, 2005, TENG, 2006), estão entre as infecções mais comumente observadas e representam uma grande preocupação de saúde pública mundial.

Atualmente, embora a placa dento-bacteriana seja primordial na iniciação e manutenção da doença periodontal, sabe-se que fatores relacionados ao hospedeiro são fundamentais na progressão da doença (VAN DYKE, 2005).

Um dos estudos mais relevantes que demonstram a importância da resposta do hospedeiro, foi à análise longitudinal feita por LOE *et al.* (1986) num grupo de plantadores de chá do Sri Lanka. Os autores verificaram que, embora vivendo sob as mesmas condições de saúde, dieta alimentar, higiene bucal e ausência de cuidados odontológicos especializados, os indivíduos apresentavam diferentes formas de destruição periodontal. Do total de indivíduos analisados, 8% mostraram rápida e severa destruição dos tecidos periodontais de suporte, 81% mostraram progressão e severidade moderada, enquanto que 11% dos pacientes não apresentaram destruição dos tecidos periodontais de suporte, além da gengiva marginal. Os autores atribuíram a diferença na severidade e progressão da doença a fatores relacionados ao hospedeiro.

Variações na taxa de progressão e severidade das doenças periodontais podem ocorrer até mesmo sob condições semelhantes de controle e acúmulo de placa. Diferentes expressões clínicas e histológicas das doenças periodontais na população mundial têm sido atribuídas a variações de suscetibilidade individuais (VAN DYKE; SHEILESH, 2005).

Existe uma população de indivíduos que não respondem satisfatoriamente ao tratamento periodontal local e sistêmico convencionais (raspagem e alisamento dentário e antibioticoterapia), continuando a perder inserção periodontal apesar dos esforços do profissional e do próprio indivíduo. Um estudo longitudinal de 22 anos

realizado por HIRSCHFIELD; WASSERMAN (1978) classificou essa população como “*decadente*” (perda de 2-9 dentes mesmo após tratamento periodontal), ou pacientes “*extremamente decadentes*” (perda de 12-32 dentes após tratamento periodontal). Esses dois tipos de pacientes são classificados como intratáveis ou refratários, em relação aos casos de periodontite crônica e agressiva.

Quando o tratamento periodontal convencional e as visitas periódicas ao consultório odontológico, realizadas de 3 a 4 vezes ao ano, não funcionam efetivamente, possivelmente a perda de inserção contínua seria resultante de fatores relacionados ao hospedeiro (KIM *et al.*, 2006).

Acredita-se que a inflamação e o colapso das estruturas periodontais seriam conseqüência da resposta de um hospedeiro susceptível à invasão de bactérias gram-negativas (SCHENKEIN 2006). A etiologia da doença periodontal é multifatorial com patógenos e seus componentes servindo como fatores de iniciação da lesão periodontal. O hospedeiro desempenha um papel essencial na progressão e severidade da doença.

1.1-ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA DOENÇA PERIODONTAL

A despeito de extensas investigações realizadas, os exatos mecanismos patogênicos responsáveis pelo desenvolvimento da periodontite não são conhecidos. A maior parte das evidências sugere que a inflamação e destruição das estruturas periodontais são conseqüência das reações de suscetibilidade do hospedeiro a bactérias patogênicas (SCHENKEIN, 2006). A etiologia da doença periodontal é multifatorial, com patógenos e seus componentes na placa dental atuando como fatores de iniciação. Aproximadamente 700 espécies bacterianas distintas foram identificadas na cavidade oral. Várias evidências de diferentes graus de impacto existem, implicando em um número limitado destes organismos como patogênicos. A evidência mais forte implicando determinada espécie bacteriana na etiologia da doença periodontal está atualmente correlacionada a quatro espécies bacterianas: *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans (A.a.)*, *Porphyromonas gingivalis (P.g.)*, *Tannerella forsythia(T.f.)* e *Treponema denticola (T.d.)* (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006).

A presença de muitas espécies bacterianas, tais como organismos comensais, é compatível com a manutenção de saúde. Neste estado, a resposta do hospedeiro existe em homeostasia com os microorganismos presentes em determinado local. Este equilíbrio pode ser rompido por alterações na qualidade e quantidade da microbiota ou devido a modificações na resposta do hospedeiro, que podem ser causadas por modulações sociais ou comportamentais, ou por fatores genéticos e epigenéticos (SCHENKEIN, 2006).

Os elementos microbianos são considerados como fatores de iniciação da doença, embora grande parte do dano observado na periodontite pode ser atribuído ao próprio hospedeiro. O influxo de bactérias e seus produtos no periodonto é acompanhado pelo desencadeamento de uma resposta imune, consistindo de células imunológicas inatas e adaptativas, bem como seus mediadores solúveis. Estudos têm demonstrado que até mesmo em tecidos saudáveis há presença de células do sistema imune, tais como células dendríticas, macrófagos, polimorfonucleares e linfócitos (JOTAWANI *et al.*, 2001).

MICHALOWICZ *et al.* (2000) em estudo em gêmeos, demonstraram que até 50% da suscetibilidade à doença periodontal crônica está correlacionada a fatores hereditários. A base biológica para as diferenças genéticas está provavelmente correlacionada a genes de susceptibilidade do hospedeiro.

As desordens genéticas associadas à periodontite, tais como a síndrome de Papillon-Léfévre, enfatizam a importância dos fatores hereditários na determinação à suscetibilidade à doença periodontal, visto que fatores genéticos individuais não podem ser modificados. Outros fatores de risco conhecidos, por outro lado, podem e devem ser controlados para possivelmente resultar em alterações na suscetibilidade à doença periodontal (GRAVE; JIANG, GENCO, 2000).

A resposta do hospedeiro pode exercer papel dicotômico na doença periodontal. Por um lado, o hospedeiro é essencial para a proteção contra a agressão bacteriana e, por outro, o processo de doença é mediado por fatores do hospedeiro.

Nas doenças periodontais, como em qualquer outra infecção, a resposta do hospedeiro desempenha dois papéis antagônicos: enquanto exercem atividade de proteção, potencialmente intermediam mecanismos destrutivos que podem promover a progressão da doença periodontal (TENG, 2006).

Um desequilíbrio dos mecanismos imunológicos tem sido atribuído à incapacidade do organismo em eliminar os patógenos e à destruição tecidual. Entretanto ainda não está estabelecido o mecanismo pelo qual o processo de inflamação é iniciado em sítios previamente saudáveis (SCHENKEIN, 2006). O papel de vários mediadores celulares e moleculares tem sido investigado na doença periodontal, incluindo o papel dos linfócitos T e B, macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos, bem como o papel das citocinas e quimiocinas.

1.2- CÉLULAS T E SEU PAPEL NA DOENÇA PERIODONTAL

Linfócitos T ou células T são células da resposta imune adaptativa, responsáveis pela resposta imune mediada por células. São considerados como reguladores chave na iniciação e resolução da resposta imune. Além disso, essas células possuem funções efetoras na indução da morte por toxicidade.

As células T podem ser classificadas de acordo com suas características fenotípicas ou funcionais. Fenotipicamente, as células T diferem-se entre si com base nas diferentes moléculas que expressam em sua superfície, tais como CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ ou TCR $\gamma\delta$ (SAWA *et al.*, 1999).

Funcionalmente podem ser classificadas em células auxiliares, inflamatórias ou citotóxicas. As células T citotóxicas expressam a molécula CD8 em sua superfície. Essa subpopulação de células T reconhece e mata células infectadas por vírus ou células alteradas. Por outro lado, células T auxiliares expressam em sua superfície a molécula CD4 e podem desempenhar tanto funções regulatórias como efetoras. As células T auxiliares podem ser subdivididas em duas populações principais: linfócitos T auxiliares 1 e 2 (Th1 e Th2), com base na expressão de citocinas produzidas e liberadas por essas células (RONCAROLO, LEVINGS, TRAVERSARI, 2001).

Células Th1 secretam IL-2 e IFN- γ enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10. Essas duas subpopulações de células T CD4 possuem funções distintas. Células Th2 regulam a imunidade humoral e são os principais ativadores dos linfócitos B. As células Th1 são essenciais na ativação dos macrófagos, regulando a imunidade mediada por células. Essas duas subpopulações de células T regulam-se entre si. IL-10 pode prevenir o desenvolvimento de Th1 e IFN- γ pode inibir a ativação das células Th2. Recentemente, a existência de uma subclasse de

células Th3 produtoras de TGF- β vem sendo relatada. Acredita-se que essas células desempenhem um papel regulatório importante durante a resposta imune (CERWENKA *et al.*, 1999). TGF- β possui ação supressora sob células T, células B, macrófagos, entre outras células (PRUD' HOMME; PICCIRILLO 2000).

Devido aos diferentes efeitos dessas citocinas, o recrutamento seletivo local e/ou ativação dos clones das células Th1 e Th2 provavelmente determinariam o resultado nos sítios com doença, inflamação crônica, reparo e regeneração (TENG, 2002).

1.3- RESPOSTA REDUZIDA DO HOSPEDEIRO NA DOENÇA PERIODONTAL

Estudos demonstram que a resposta das células T (presentes no tecido gengival e no sangue) aos periodontopatógenos apresenta-se reduzida ou ineficaz em casos de doença periodontal severa. O mecanismo exato dessa resposta reduzida ainda não está bem definido. Fatores imunossupressores de alguns periodontopatógenos vem sendo identificados e isolados (SHENKER *et al.*, 1990, KURITA-OCHIAI, OCHAI *et al.*, 1992).

Tem sido demonstrado que fatores imunossupressores purificados de *A.a.* (ISF) induzem a parada da fase G2 no ciclo das células T. Recentemente, demonstrou-se que ISF é um membro da família de toxinas citoletais (CDT) (SHENKER *et al.*, 1999). Assim, é possível que a resposta reduzida das células T aos periodontopatógenos possa interferir na resposta das células B, assim como na capacidade de resistir à destruição periodontal.

Desde que a interação entre a molécula B7 nas células apresentadoras de antígenos e CTLA-4 presente nas células T foi demonstrada ser importante no estabelecimento da tolerância, o papel de CTLA-4 na doença periodontal vem sendo estudado. ORIMA *et al.* (1999) demonstrou que sítios afetados pela doença periodontal apresentam aumento na expressão de CTLA-4.

Além disso, alguns estudos mostram que grande porcentagem de células T obtidas de pacientes com doença periodontal expressam CTLA-4, quando estimuladas com *P.g.* A ligação de CTLA-4Ig (uma proteína de fusão do CTLA-4 e o fragmento deFc da IgG) com B7 presente nas células apresentadoras de antígeno

inibe *in vitro* a resposta proliferativa ao A.a. de clones de células T de ratos (KAWAI *et al.*, 2000).

Observou-se que a administração *in vivo* de CTLA-4Ig inibe em ratos a perda óssea induzida por clones de células T na doença periodontal. O papel das subpopulações de células T regulatórias na doença periodontal vem sendo alvo de muitos estudos. A indução da resposta imune patógeno-específica das células Th1 e Th2 é mandatória na proteção do hospedeiro. Falhas nesse mecanismo podem levar a processos patológicos fatais. Se o mesmo mecanismo de proteção não for propriamente regulado, isto pode gerar patologias imuno-mediadas (MAO *et al.*, 2007).

Muitos estudos tentam determinar o perfil de citocina das células Th1 e Th2 produzidas na doença periodontal, mas ainda existem muitas controvérsias. O entendimento sobre o controle da ação das células Th1 e Th2 é potencialmente significativo para compreensão dos mecanismos imunoregulatórios da doença periodontal.

Acredita-se que interações de alta afinidade dos receptores de células T levam a uma resposta Th1, enquanto interações de baixa afinidade T direciona a uma resposta Th2, mecanismo que parece controlar o perfil Th1 e Th2 e inclui natureza do antígeno, apresentação de antígeno e a resposta imune inata. O desenvolvimento e regulação da resposta imune depende da produção e citocinas que podem determinar a natureza da resposta, destrutiva ou protetora (AZUMA *et al.*, 2003).

A resposta imune a infecções é regulada pelo balanço entre as citocinas produzidas pelas células Th1 e Th2. As citocinas produzidas pelas células Th1, IL-2 e IFN- γ amplificam a resposta mediada por células, enquanto que IL-4, produzida pelas células Th2, tem função de suprimir a resposta mediada por células e conseqüentemente aumentar a resistência associada à imunidade humoral (TENG, 2002).

Estudos demonstram a presença de células T e B nos tecidos afetados pela doença periodontal. A imunidade mediada por células Th1 contra antígenos intracelulares ativa macrófagos e promove a secreção de anticorpos pelas células B (TENG, 2006).

1.4-CÉLULAS T REGULATÓRIAS

Foi identificada outra subpopulação de células T CD4⁺ com funções e perfil de citocinas diferentes de Th1 e Th2. São conhecidas como células T regulatórias (Tr) e também são originadas das mesmas precursoras das células Th1 e Th2. Primeiramente identificou-se que a função dessas células era de manutenção da tolerância periférica e homeostasia da área de superfície das mucosas e que elas poderiam ser direcionadas contra antígenos das próprias células (THOMPSON, POWRIE, 2004).

Tr são importantes reguladores negativos do sistema imune, prevenindo resposta imune patológica contra microbiota entérica do organismo ou contra infecções microbianas. Também podem mediar a tolerância do hospedeiro após cirurgias de transplante (órgãos e tecidos) e a tolerância materna ao feto (THOMPSON, POWRIE, 2004). Entretanto, a ativação das células Tr não é sempre benéfica ao hospedeiro; essas células podem impedir a imunidade anti-tumoral e a imunidade protetora aos microrganismos patológicos (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ, 2004).

Populações de células Tr com fenótipos e ações distintas foram identificadas: células T regulatórias tipo 1 (Tr1), células T regulatórias tipo 3 (Tr3), células CD4⁺CD25⁺ e células T regulatórias CD8⁺ (SUGIMOTO, *et al.*, 2006).

Células Tr1 secretam altos níveis de IL-10, e de moderados a baixos níveis de fator de crescimento transformador β (TGF)- β (RONCAROLO; LEVINGS; TRAVERSARI, 2001). Essa subpopulação de células Tr também secretam baixíssimos níveis de IL-5, IL-2, IL-4 e IFN- γ .

Estudos sugerem que as células Tr1 têm função imunossupressora e de prevenção de doenças auto-imunes mediadas pelas células Th1, além de suprimir resposta inflamatória Th1 e Th2 (TENG, 2006).

A população de células CD4⁺CD25⁺ corresponde a 5-15% da população total de células CD4⁺ circulantes. Experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstram que elas possuem grande habilidade imunossupressora. Essas células inibem o desenvolvimento de doenças auto-imunes e modulam a resposta imune do hospedeiro a processos de infecciosos (SUGIMOTO *et al.*, 2006).

Células Tr3 secretam TGF- β , e têm como função primordial a homeostasia em muitos aspectos da regulação imune e das células T. Além disso, estudos mostram que essas células auxiliam a produção de IgA pelas células B (GORELIK; FLAVELL, 2002).

Em um indivíduo normal, as células Tr mantêm a homeostasia, previnem a inflamação na superfície das mucosas e permitem a resposta das células Th1 e citotóxicas a infecções e ao controle de tumores. Entretanto, um desequilíbrio na função regulatória e efetora dessas células pode levar a certos processos patológicos. Acredita-se que as células T regulatórias possam estar aumentadas na infecção crônica e no câncer, resultando na supressão da resposta imune Th1. Em contraste, a resposta imune Th1 elevada pode contribuir para o desenvolvimento de doenças auto-imunes e rejeição do hospedeiro a enxertos ou transplantes. Portanto, estratégias de controle desse desequilíbrio das funções de células T podem auxiliar no tratamento de certos quadros patológicos e de rejeição do hospedeiro a transplantes de órgãos e tecidos (THOMPSON, POWRIE, 2004).

1.5-RANK/RANK-L

Interações entre o receptor do fator nuclear kB (RANK) e seu ligante (RANK-L) são cruciais na formação dos osteoclastos. RANK-L é uma molécula transmembrânica da família do ligante do fator de necrose tumoral (TNF) composta de 316 aminoácidos (38kDa). Inicialmente, RANK-L foi observado e caracterizado como uma proteína de linfócito T. Subseqüentemente, RANK-L foi detectado em células do estroma de medula óssea e osteoblastos. Atualmente, sabe-se que a maioria das células de um organismo humano produz RANK-L (ANDERSON, 1997). Entre as populações de células T, RANK-L é produzido por células T CD4+ e CD8+ T ativadas. Alguns tecidos, como os linfonodos, baço, células CD4-imaturas, tímócitos e órgãos linfóides intestinais, também expressam RANK-L.

Estudos *in vitro* demonstram que RANK-L não somente ativa osteoclastos maduros, como também media a osteoclastogênese, podendo contribuir para o processo de reabsorção óssea (HAMDY, 2007, McCORMICK *et al.*, 2007, BAUD'HUIN *et al.*, 2007).

RANK-L é altamente expresso em órgãos linfóides e osso trabecular, especialmente em áreas associadas com remodelação óssea ativa e/ou osteólise inflamatória. Essa molécula é essencial e representa *in vivo* e *in vitro* um sinal para completa diferenciação dos osteoclastos, de precursores hematopoiético de células T em osteoclastos multinucleados maduros, na presença de fator estimulador de colônia (CSF).

RANK-L é expresso na superfície dos osteoblastos e células-tronco da medula óssea e interage como receptor de superfície RANK presente nos pré-osteoclastos (induzida por M-CSF) e osteoclastos maduros, estimulando sua fusão, desenvolvimento reabsorção óssea e sobrevivência celular (TENG, 2003).

Tem-se demonstrado que RANK-L está presente no fluido crevicular gengival (FCG), assim como na gengiva de pacientes adultos com periodontite crônica (VERNAL *et al.*, 2004).

Comparando a expressão de RANK-L em sítios com e sem doença periodontal, estudos demonstram níveis de RANK-L aumentados em sítios doentes (MAHAMED *et al.*, 2005, TENG, 2006). Altos níveis de RANK-L encontrados no FCG de pacientes periodontais sugerem seu papel no processo de destruição óssea, remodelação e sua correlação com a patógenos da doença periodontal.

VERNAL *et al.* (2004) analisando sítios com doença periodontal demonstraram que a quantidade de RANK-L era maior em sítios com doença periodontal ativa, considerando essa molécula como marcador de atividade de progressão desta doença (TENG, 2006).

1.6-APOPTOSE

Duas formas de morte celular podem ocorrer nas células dos mamíferos: necrose ou apoptose.

Na necrose, a desintegração celular ocorre em resposta a uma injúria química ou física. Algumas das primeiras etapas no processo de necrose celular são alterações funcionais e morfológicas na mitocôndria, resultando, assim, na incapacidade da célula em manter sua homeostasia. Em seguida, a membrana plasmática perde sua habilidade no controle da pressão osmótica, levando à destruição celular. Conseqüentemente, ocorre a liberação de seus constituintes para

o meio extra-celular, iniciando assim, um processo inflamatório. Os restos celulares provenientes da necrose são então eliminados pelos fagócitos (COHEN, 1993). O processo de necrose celular pode causar déficit funcional ao hospedeiro.

A outra forma de morte celular é conhecida como apoptose ou morte celular programada. Na apoptose, ou “suicídio celular”, a célula participa de sua própria desintegração. Sob condições fisiológicas, a apoptose é uma resposta celular normal, responsável pela manutenção da homeostasia tecidual. A apoptose ocorre como parte do processo de desenvolvimento de todos os organismos multi-celulares, assim como, durante o curso da resposta imune. Um exemplo de apoptose ocorre durante o processo de seleção clonal, que por sua vez faz parte do desenvolvimento das células B e T. Durante a maturação das células B na medula óssea, clones de células B com imunoglobulinas que se ligam com extrema afinidade aos constituintes da medula óssea são induzidos a entrar em apoptose. Um outro exemplo desse processo pode ser observado na seleção negativa durante o desenvolvimento das células T no timo; células que possuem receptores com afinidade de ligação com moléculas próprias de histocompatibilidade (MHC) ou que podem reagir com antígenos próprios são induzidas a entrarem em apoptose (COHEN; DUKE, 1992).

Atualmente, sabe-se que o processo de apoptose desempenha um papel primordial na manutenção da homeostasia do sistema imune, ou seja, é um mecanismo responsável pelo desenvolvimento, ativação e função efetora celular. (BULUT et al., 2006).

A apoptose pode ser modulada por vários estímulos, incluindo hormônios, citocinas, fatores de crescimento, infecções bacterianas ou virais e pela resposta imune (THOMPSON, 1995).

O processo de apoptose é o resultado de uma cascata de eventos, que por sua vez, inicia-se pela sinalização por meio de receptores celulares, membros da família do fator de necrose tumoral. A marca registrada da apoptose é a desintegração do núcleo por nucleases endógenas (enquanto outras organelas mantêm-se intactas) em 200 pares de base, e clivagem da cromatina em fragmentos nucleares (COHEN; DUKE, 1992).

A apoptose pode ser induzida por diferentes mecanismos. Atualmente, o mecanismo mais bem definido é quando o Fas-ligante (Fas-L) une-se ao receptor Fas nas células-alvo (ABRAHAMS; KAMSTEEG; MOR, 2003). Essa ligação inicia a

ativação da cascata das caspases, culminando com a ativação da DNase, que promove a clivagem do DNA genômico.

O outro mecanismo de ativação da apoptose, envolve o fator de necrose tumoral (TNF) e seus receptores celulares. Muitas moléculas estão envolvidas na regulação do processo apoptótico. BCL é uma família de proteínas reguladoras da apoptose. Alguns membros dessa família (BCL-2 and Bcl-XI) inibem a apoptose , enquanto outros (Bax and Bad) promovem apoptose (REED, 1994).

Durante o processo de apoptose, a mitocôndria sofre alterações liberando o citocromo C (proteína), que pode contribuir para a ativação da cascata das caspases. BCL-2 une-se à superfície da mitocôndria bloqueando a liberação do citocromo C, inibindo assim a apoptose.

A homeostase requer um balanço delicado entre os fatores de promoção e inibição da apoptose, mantendo assim constante o número de células constante (THORNBERRY, 1988).

Como brevemente citado, a apoptose pode ser ativada por diferentes estímulos, entre eles, o sistema imune. Linfócitos T citotóxicos destroem seus alvos, induzindo nos mesmos a apoptose. Células T citotóxicas liberam moléculas efetoras que ativam mecanismos apoptóticos endógenos. Uma vez que essas células reconhecem seu alvo, como por exemplo um antígeno, liberam grânulos especializados (THOMPSON, 1995). Esses grânulos, são lisossomos modificados que possuem 3 tipos diferentes de proteínas ativas, perforina, enzima granular e granulisina.

Perforina, a maior constituinte desses grânulos, ao entrar em contato com as células-alvo cria na camada lipídica dessas células poros transmembrânicos. Esse processo faz com que a célula perca sua integridade, permitindo a entrada de água e sais no seu interior, promovendo sua rápida desintegração. A segunda classe é o grupo das enzimas granulares, que é composto por 3 proteínas digestivas que também podem desencadear o processo de apoptose por meio de ativação da cascata das caspases. A terceira classe é a granulisina, proteína que tem habilidade de induzir apoptose nas células-alvo, e possuem ainda ação microbiana. (THOMPSON, 1995).

Existe ainda, um segundo mecanismo independente da perforina que também possui capacidade de ativar apoptose. Esse mecanismo envolve a ligação

do Fas com o ligante Fas na membrana das células-alvo, presente na membrana das células T citotóxicas ativadas, Th1 e Th2. Células fagocíticas reconhecem rapidamente uma célula apoptótica porque uma vez que a integridade da membrana plasmática é quebrada, representa um sinal de que a célula entrou em apoptose (THORNBERRY, 1998).

1.6.1-APOPTOSE COMO UM MECANISMO DE VIRULÊNCIA DA BACTÉRIA

A presença de um mecanismo no qual o hospedeiro participa de sua própria destruição tem sido um alvo óbvio para o fator de virulência de alguns microrganismos. Diferentes microrganismos induzem apoptose em determinadas células. A indução do processo apoptótico patógeno-específica pode servir para eliminar células-chave no processo da resposta imune ou interferir nas defesas do hospedeiro, diminuindo a eficácia da mesma. Alternativamente, a supressão da apoptose pode facilitar a proliferação de patógenos intra-celulares (WEINRAUCH *et al.* 1999).

1.6.2-APOPTOSE POR PATÓGENOS PERIODONTAIS

Os mecanismos responsáveis pela iniciação da inflamação periodontal ainda não estão bem definidos, e tanto ações imune-mediadas como efeitos citopáticos direto das bactérias podem estar envolvidos.

Resultados de estudos com cultura de bactérias sugerem que a apoptose pode desempenhar um papel importante na doença periodontal (GRAVES; JIANG; GENCO, 2000). Entretanto, ainda não foram estabelecidos os mecanismos moleculares que participam na patogênese da doença.

Patógenos periodontais, tais como *A.a* (MANGAN; WAHL, 1991, NALBANT; ZADEH, 2000, 2001, 2002, NALBANT; CHEN; WANG; ZADEH, 2003, LANE *et al.*, 2005) e *P.g.* (BROZOVIC *et al.*, 2006, MAO *et al.*, 2007) têm habilidade de induzir nos linfócitos a morte por apoptose.

WANG *et al.* (2003) testaram *in vitro* os efeitos citotóxicos de proteases provenientes de *P.g.* em fibroblastos gengivais humanos. Os autores concluíram que

essas proteínas podem induzir apoptose nas células do hospedeiro, contribuindo, assim, para etiologia da doença periodontal. Embora o mecanismo de indução pelo qual ocorre a apoptose ainda não tenha sido estabelecido, os autores acreditam que proteínas de periodontopatógenos como *P.g.* destruam componentes celulares importantes como proteínas do citoesqueleto.

A.a. expressa duas toxinas conhecidas por possuírem propriedades citolíticas contra as células humanas, conhecidas como leucotoxinas (ltx) e toxinas citoléticas (CDT). Tem-se demonstrado que leucotoxinas promovem apoptose nas células T. (MANGAN; WAHL, 1991, NALBANT; ZADEH. 2000, SHENKER *et al.*, 2001).

CDT é uma proteína solúvel expressa por vários organismos gram-negativos tais como *A.a.* (Sugai *et al.* 1998; Shenker *et al.* 1999; Shenker *et al.* 2000), *Haemophilus ducreyi* (Cope *et al.*, 1997), *Escherichia coli* (SCOTT *et al.*, 1994; PEREZ; KAPER, 1997), e *Campylobacter jejuni* (Whitehouse *et al.*, 1998). CDT pode causar parada irreversível do ciclo G2 e subsequente morte celular.

Nalbant; Zadeh (2002) postularam que alguns periodontopatógenos putativos, tais como *A.a.*, induzem ativação antígeno não-específica em larga escala das células, e a maioria delas são eliminadas por apoptose. Células Tr são ativadas, suprimido a resposta das células T antígeno-específicas. Os autores também propuseram que um potente estimulante antigênico não-específico leva à ativação de um grande número de células T, que se expandem tremendamente, enquanto produzem pouca quantidade de IL-2. Essa situação cria uma necessidade massiva de IL-2 em relação ao suprimento total, que pode limitar a expansão antígeno-específica das células T. Células regulatórias diferenciam-se em células efetoras produzindo citocinas imunossupressoras (IL-10 e TGF- β) que poderiam suprimir a resposta antígeno-específica. *A.a.* também expressa várias toxinas citolíticas que promovem a interação Fas-FasL entre as células T e as células apresentadoras de antígenos (ZADEH; NALBANT; PARK, 2001).

Como resultado, grande parte células T que responderam ao estímulo antigênico são mortas por apoptose, potencialmente eliminando células T ativadas antígenos-específicas. Devido a esses mecanismos invasores, o patógenos é capaz de sobreviver e induzir estimulação persistente das células apresentadoras de antígenos, promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α),

responsáveis pela ativação dos osteoclastos, que induzem destruição tecidual (NALBANT *et al.*, 2003).

As células T talvez possam também contribuir na ativação dos osteoclastos por meio da liberação de RANKL. Assim, os produtos imunomodulatórios do A.a. podem interferir no estabelecimento de uma imunidade estável contra esse microrganismo, permitindo a ele a capacidade de persistir, enquanto a resposta inflamatória ativa mecanismos de destruição tecidual do hospedeiro (NALBANT *et al.*, 2002).

1.7-EXPRESSÃO GENÉTICA E MICROARRAY

Em 2003, um projeto muito importante foi concluído: o “Projeto Genoma”. Resultado de um estudo de 13 anos que envolveu vários países, inclusive o Brasil, esse projeto identificou que o genoma humano (DNA e todos seus genes) contem aproximadamente 30.000 genes.

Aproximadamente 99% do genoma de uma determinada espécie são os mesmos e o restante 1% corresponde aos polimorfismos (BROWN; BOTSTEIN, 2000). Todas as células de um organismo possuem a mesma sequência de DNA, com exceção dos linfócitos T e B, que rearranjam seus genes responsáveis pelos receptores nas células T e pelas imunoglobulinas nas células B.

Vários métodos vêm sendo utilizados para análise da expressão genética, entre elas pode-se citar: *northern Blot*, *dot blot*, ensaio de deslocamento, entre outras.

A principal limitação dessas técnicas é a impossibilidade da análise de mais de um gene por experimento, e a necessidade de grandes quantidades de RNA. (KUO *et al.*, 2004).

A técnica de transcrição reversa, reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foi desenvolvida objetivando minimizar a utilização de grandes quantidades de RNA, porém a limitação na possibilidade da análise de um único gene por vez ainda persistia.

Entre as aplicações da identificação do genoma humano, está a possibilidade do estudo de um grande número de genes. Uma das tecnologias mais significativas até hoje desenvolvidas são os *arrays de* hibridização, que podem ser classificados

em 4 grupos: oligonucleotídeos de alta densidade, microeletrônicos, *macroarray* e *microarray*.

Os “*arrays*” com oligonucleotídeos de alta intensidade utilizam fotolitografia para fabricação *in situ*, das sondas sob a matriz. Esses “*arrays*” contém *sondas*, que possuem uma fita simples de DNA, e podem ser encontradas pela Affymetrix®.

Os “*arrays*” microeletrônicos são as formas mais novas de “*arrays*” de hibridização. A matriz é feita de eletrodos que geram um campo elétrico que imobiliza as “*probes*” e controla a hibridização do alvo. Assim, os eletrodos podem mover ácidos nucléicos e também proteínas ao redor da matriz. Atualmente outros métodos de “*arrays*” de hibridização, tais como de detecção química e baseados em esferas vêm sendo desenvolvidos.

Macroarrays, uma evolução dos primeiros “*arrays*” utilizam “*probes*” fabricadas e depositadas roboticamente nas matrizes. Essa técnica utiliza alvos marcados radiotivamente, e usualmente contém de 200 a 5000 genes.

Outro tipo de “*arrays*” de hibridização de DNA são os *Microarrays*, desenvolvidos por PO Brown, em 1995, na Universidade de Stanford (Califórnia, USA). O *microarray* também podem monitorar a transcrição de milhares de genes de uma única vez, mas diferem da técnica do *macroarray* de 3 maneiras: tipo de matriz, tipo de detecção e densidade. O *microarray* utiliza vidro, plástico ou nylon como matriz e camada de marcação fluorescente. Além disso, a técnica do *microarray* apresenta sondas de maior densidade das encontradas nos *macroarrays* (KUO *et al.*, 2002).

Resumidamente, essa técnica utilize um *microchip*, que é constituído de uma matriz (de plástico, vidro, nylon, etc). Essa matriz contém as chamadas sondas, ou sequência genética específica, que são seqüências de ácidos nucléicos dos genes a serem investigados. As sondas são depositadas na matriz de maneira análoga a uma impressão, por meio de uma impressora jato de tinta. Os ácidos nucléicos extraídos dessas células, ou tecidos a serem estudados são então hibridizados aos “*arrays*” e as reações positivas com essas “*probes*” são consideradas expressões genéticas positivas (KUO *et al.*, 2002).

Outra grande vantagem dos *microarrays* é a possibilidade de hibridização em uma pequena câmara de hibridização, reduzindo assim o volume da amostra.

Quando a expressão genética é analisada em escala global, é possível estudar simultaneamente a expressão de milhares de genes. Uma das limitações dessa técnica é o grande volume de dados complexos obtidos com esse experimento, e a falta de técnicas que facilitam a interpretação desses dados.

Uma possibilidade para minimização dessas desvantagens é limitar o número de genes a serem estudados, ou seja investigar genes relacionados a mecanismos de interesse do pesquisador, ou mecanismos funcionais comuns.

Esses “arrays” mecanismo-específicos ou também chamados de “*microarray* focado” podem ser utilizado para investigar um menor número de genes, relacionados com mecanismos biológicos específicos (por exemplo citocinas, apoptose, etc). Assim gera-se, menor volume de dados, e conseqüentemente facilita-se a interpretação dos resultados.

Com o desenvolvimento da tecnologia do *microarray*, o foco de uma ciência baseada puramente em hipótese passou para uma ciência baseada no descobrimento. Com o desenvolvimento da tecnologia do *microarray*, o investigador limita-se a uma hipótese específica e estuda a expressão global de vários genes, o que permite que num segundo momento sejam desenvolvidas hipóteses específicas à partir dos dados observados.

A tecnologia do *microarray* é uma ferramenta poderosa no estudo do perfil genético, favorecendo o entendimento de como esses genes trabalham e guiam as funções fisiológicas celulares e como pequenas alterações e variações levam a processos patológicos (KUO, 2004).

Em odontologia, somente nos últimos anos tem se utilizado a tecnologia do *microarray* para a investigação de patologias, especialmente em câncer de cabeça e pescoço. Na periodontia poucos estudos empregando *microarray* para análise da doença periodontal estão disponíveis em literatura.

GRONERT *et al.* (2004) foram os primeiros a utilizar *microarray* (abordagem global) para realizar uma análise molecular de defeitos congênitos de neutrófilos, observados em pacientes com periodontite agressiva. Os resultados obtidos com *microarray* e confirmados por PCR em tempo real demonstram diminuição no nível da expressão do gene da quimase diacilglicerol (DAGK) em neutrófilos de pacientes periodontais. Os autores concluíram que um defeito na expressão de RNA para DAGK, observada nos pacientes com periodontite agressiva, pode ser o mecanismo

molecular chave na regulação dos mecanismos de sinalização dos neutrófilos, causando diminuição na função dessas células.

De acordo com a literatura, ARAKI *et al.* (2004) foram os primeiros pesquisadores a utilizar microarray focado. Os autores analisaram alterações na expressão de genes relacionado a fatores de virulência da *P.g.*, associando a severidade da destruição periodontal.

HAKKI *et al.* (2005) objetivando uma melhor compreensão dos possíveis mecanismos que levam a quadros de hiperplasia gengival em pacientes com fibromatose hialina juvenil (FHJ), monitoraram a expressão genética de fibroblastos gengivais obtidos desses pacientes, comparados à expressão de fibroblastos gengivais saudáveis (controle). Os resultados obtidos com microarray mostraram que a expressão de genes relacionados à renovação celular e remodelação do tecido conjuntivo estava desregulada nos pacientes com FHJ.

KIM *et al.* (2005) analisaram a expressão genética de 7 pacientes com periodontite refratária (grupo experimental) e 7 pacientes periodontalmente saudáveis (grupo controle), e identificaram vários genes alterados na amostras periodontais. Os autores concluíram que um desequilíbrio na regulação desses genes, pode ser considerado como indicador e marcador da doença periodontal. Afirmaram que a técnica do microarray vem contribuindo bastante tanto para as pesquisas de áreas básicas, como em estudos voltados para clínica, e que a análise da expressão genética por meio de técnicas como microarray mudará o futuro da prática da medicina e odontologia.

RODRIGUES; PROGULSKE-FOX (2005) utilizaram microarray para identificar possíveis alterações nos genes da *P.g.*, durante a invasão de células endoteliais das artérias coronarianas.

GEMMELL; DRYSDALE; SEYMOUR (2006), utilizando microarray, analisaram em ratos variações na expressão genética de células CD4 e CD8 após injeção de *P.g.* Os resultados demonstraram que infecções com *P.g.* promovem nessas células um desequilíbrio na expressão de muitos genes, diminuindo assim a efetividade da resposta imune.

Para estudar *in vitro* o efeito do Emdogain® sobre os osteoblastos, CARINCI *et al.* (2006) monitoram a expressão genética de 20.000 genes por meio de microarray. Os autores encontraram vários genes supra e infra-regulados.

Concluíram que o Emdogaim® pode modular uma série de processos biológicos nos osteoblastos, entre eles regulação do ciclo celular, transcrição, tradução, sinais de transcrição, apoptose, sistema imune, etc.

STEINBERG *et al.* (2006) analisaram *in vitro* por microarray os efeitos das ações mediadas pela IL-1 β na transcrição de RNA mensageiro e a ação putativa do NF-kB em cultura de ceratinócitos gengivais humanos (obtidos de sites com doença periodontal). Os autores identificaram, além dos já conhecidos, novos genes possivelmente envolvidos na iniciação e manutenção de doenças inflamatórias.

MILWARD *et al.* (2007) investigaram efeitos moleculares das células do epitélio oral na presença de dois periodontopatógenos (*Fusobacterium nucleatum* e *P.g.*). Os resultados obtidos com microarray e confirmados por PCR em tempo real indicaram que processos de transcrição regulados pelo mecanismo do fator NF-kB (citocinas, quimiocinas, entre outros) estavam supra-regulados na presença dos periodontopatógenos. Os autores observaram que *Fusobacterium nucleatum* induziu número maior de alterações na expressão genética das células do epitélio oral, do que a *P.g.* Observaram também que os dois patógenos induziram alterações comuns em 91 genes. Essas alterações podem representar processos biológicos comuns associados à doença periodontal.

A análise da expressão genética permite uma ampla visão do genoma e múltiplos acessos a pontos de sua natureza. Essa possibilidade pode ser um instrumento no entendimento do código da vida, mas para isso é necessário que esses pontos estejam integrados, sendo capazes de capturar a conexão entre estrutura e função do genoma humano.

O genoma não é estático e importantes funções somente poderão ser reveladas por seu comportamento dinâmico. Atualmente, a tecnologia do microarray permite uma visão da expressão de genes num momento em particular, e também possibilita combinar vários momentos na expressão gênica, o que nos permite juntar as informações e montar um quebra-cabeças ou um quadro do comportamento do genoma.

STEINBERG *et al.* (2006) acreditam que a análise da expressão genética permite identificar uma rede de genes associados a processos inflamatórios.

A análise global do comportamento do genoma revela grupos de genes com expressões similares e sugerem novos papéis para alguns genes pela associação

com a expressão de outros genes. A visão da função global oferece ainda a oportunidade de irmos além das similaridades e buscarmos o controle da expressão gênica.

PROPOSIÇÃO

HIPÓTESE

Existem diferenças na expressão genética do tecido gengival e do sangue de indivíduos com doença periodontal em comparação a indivíduos periodontalmente saudáveis.

2. Objetivos

Diante de tantos questionamentos relacionados à desregulação de mecanismos da resposta do hospedeiro, e sua participação na patogênese da doença periodontal, o presente estudo objetivou a análise qualitativa e quantitativa da diferença dos níveis de expressão genética de mecanismos de apoptose, resposta de células T, inflamação e receptores de citocinas em sítios com e sem periodontite.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1-SELEÇÃO DE PACIENTES

Essa pesquisa foi submetida ao Comitê da instituição americana em que foi realizada, denominado de “*Committee of Research of the University of Southern California*” (*Institutional Review Board at the University of Southern California*), e aprovada sob o número IRB No. HS-0344003.

Todos os indivíduos pré-selecionados para essa pesquisa foram informados da natureza, benefícios, possíveis riscos do presente estudo e seu direito de desistência durante qualquer etapa do mesmo. Foram incluídos pacientes que, após a leitura da Carta de Informação ao Paciente, aceitaram participar do estudo, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Além disso, os pacientes deveriam preencher os seguintes critérios de inclusão:

- Não ser portador de nenhuma doença sistêmica (como por exemplo, *diabetes mellitus*, pressão alta, alergia, cardiopatias, nenhum tipo de síndrome, AIDS ou doenças renais).
- Não ser fumante, usuário de drogas ou álcool.
- Não ter feito o uso de antibióticos nos 3 meses prévios ao estudo.

Os indivíduos que não se encaixaram em todos os critérios acima demonstrados foram imediatamente excluídos do estudo.

Foram selecionados 14 indivíduos (12 do sexo masculino e 2 do sexo feminino), com idades entre 18 e 65 anos (média 41,5). Os pacientes foram recrutados na clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da *University of Southern California*, de novembro de 2005 a maio de 2006.

3.2- EXAME CLÍNICO PERIODONTAL

Após completarem a ficha de anamnese (contendo questionário completo da história médica e odontológica do paciente), e fornecerem os dados demográficos (sexo, idade, etc), os pacientes foram submetidos às seguintes análises para determinação dos parâmetros periodontais:

- Profundidade de sondagem (distância compreendida entre a margem gengival e o fundo do sulco ou bolsa periodontal) - medida em milímetros com auxílio de uma sonda periodontal com marcação de Williams.
- Nível de inserção (distância compreendida entre a junção cimento-esmalte ao fundo do sulco ou bolsa periodontal) - medida em milímetros com auxílio de uma sonda periodontal com marcação de Williams.
- Sangramento a sondagem -
positivo- presença de sangramento à sondagem até 30 segundos após retirada da sonda
negativo – ausência de sangramento à sondagem
- Perda óssea - o valor estimado foi obtido por meio da análise de radiografias periapicais.
- Recessão gengival - o deslocamento apical da margem gengival foi avaliado visualmente e com auxílio de uma sonda periodontal de Williams.
- Supuração (presença ou ausência de exsudato purulento).
- Mobilidade (positiva e negativa).
- Envolvimento de furca – presença ou ausência de envolvimento de furca foi avaliada com auxílio de uma sonda periodontal de Nabers.

Os parâmetros acima citados foram analisados em 6 sítios (mésio-vestibular, centro da face vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, centro da face lingual e disto-lingual) de cada dente presente na cavidade bucal.

Por meio dos resultados obtidos dos parâmetros acima avaliados e com base no Workshop Internacional para Classificação das Doenças Periodontais (ARMITAGE, 1999), o diagnóstico periodontal foi determinado.

Sabe-se que mesmo na gengiva clinicamente saudável pode-se observar a presença de um infiltrado inflamatório histológico, portanto para esse estudo foram considerados não portadores de doença periodontal (Grupo NP), indivíduos com gengiva clinicamente saudável, com profundidade de sondagem ≤ 3 mm em todos sítios e ausência de sangramento à sondagem. Para o grupo experimental (PC) foram incluídos os indivíduos com doença periodontal crônica e com profundidade ≥ 6 mm, perda de inserção > 3 mm em mais do que 3 sítios boca toda e sangramento à sondagem no sítio de escolha.

3.3-COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras sanguíneas foram coletadas em ambos os grupos (PC e NP) antes do procedimento de anestesia (segundo o protocolo aprovado pela instituição estrangeira), pela pesquisadora previamente treinada pelo orientador estrangeiro, nos grupos experimental (PC) e controle (NP).

Depois de cuidadosa desinfecção da área com álcool 70% e gaze estéril, com auxílio de BD Vacutainer® estéril e descartável, agulha número 21 (*Becton and Dickinson and Company* 2005) aproximadamente 15 mL de sangue venoso foram coletados de todos os pacientes. Os tubos utilizados para coleta foram PAXgene® System e armazenados em tubos PAXgene™ Blood RNA system tube (*PreAnalytix®* 2006, *Qiagen, BD company*, número de catálogo 762174). Esses tubos contêm substâncias que estabilizam o RNA intracelular por alguns dias em temperatura ambiente e por semanas a 4° C. Esse sistema de coleta utilizado elimina os passos tradicionalmente requeridos para estabilização do RNA (tais como congelamento, banho, etc).

Segundo a orientação do fabricante, logo após a coleta os tubos foram mantidos por 2 horas em temperatura ambiente, e em seguida armazenados em geladeira (2-4° C) até a extração de RNA.

3.4-COLETA DAS AMOSTRAS DE GENGIVA

As amostras de tecido gengival de pacientes dos grupos PC e NP foram obtidas de áreas selecionadas em que a exodontia ou procedimentos cirúrgicos periodontais eram parte do plano de tratamento odontológico, e seriam descartadas após o procedimento (caso não fossem usadas para esta pesquisa).

Depois de realizada a anestesia indicada para a área, o dente era extraído, e a amostra de gengiva era cuidadosamente removida com o auxílio de um cabo de bisturi com lâmina 15C (ambos *HuFriedy®*). Todas as amostras tinham um diâmetro de aproximadamente 0,5 cm a 1 cm.

No grupo experimental as amostras gengivais foram coletadas do sítio mais profundo do dente escolhido. No grupo controle as amostras gengivais foram obtidas do sítio que demonstrava menor profundidade de sondagem no dente a ser extraído.

Imediatamente após a coleta, todas as amostras de tecido gengival eram armazenadas em tubos denominados de RNA *later tissue protection tubes* 50 x 1,5 mL (*Qiagen*®, número de catálogo 76154). Esses tubos promovem a estabilização e proteção de RNA intracelular, necessárias para a análise da expressão genética. Além disso, esse sistema permite a conservação das amostras em temperatura ambiente, dispensando a utilização de nitrogênio líquido para estabilização do RNA. É importante lembrar que uma vez que a amostra de interesse é coletada (gengiva ou sangue, por exemplo) o RNA torna-se instável. Estabilização e preservação imediata do RNA são pré-requisitos para obtenção de resultados de *microarray* confiáveis.

3.5 EXTRAÇÃO DE RNA

RNA total foi extraído de todas as amostras de sangue e gengiva. Para extração de RNA das amostras sangüíneas foi utilizado o kit *Versage RNABlood kit* da *Gentra*® *Systems 2004* (número de catálogo VGR-005DB2), protocolo número 400214.

Brevemente, antes de procedimento de purificação do RNA propriamente dito, todas as amostras de sangue foram agitadas em vórtex durante 20 segundos, em velocidade média. Foi adicionada a cada amostra solução de TCPE® (TCEP® and Lysis® Solution), objetivando a resuspensão celular. As amostras foram novamente agitadas em vórtex por mais 2 minutos em alta velocidade, para homogeneização das amostras, rompimento das células e conseqüente liberação do RNA.

As amostras foram transferidas para um novo tubo e centrifugadas por 1 minuto a 400 x g. A próxima etapa realizada foi a ligação do RNA ao tubo; para isso as amostras foram pipetadas para um novo tubo e centrifugadas a 13.000 x g por 1 minuto.

As amostras foram transferidas para um novo tubo, lavadas com solução de *Wash 1*® e novamente centrifugadas a 13.000-x g por 3 minutos.

As amostras foram transferidas para um novo tubo e submetidas a tratamento com solução de *DNase Wash*® e incubadas por 45 minutos em temperatura ambiente. As amostras eram então centrifugadas a 13.000 x g por 1 minuto. Lavagem adicional com solução de *DNase Wash*® e nova centrifugação a 13.000-16.000 x g por 2 minutos. A seguir, as amostras foram transferidas para um novo tubo e lavadas com solução de *Wash 2*® e centrifugadas a 13.000 x g por 1 minuto. Esse passo foi repetido e as amostras centrifugadas a 13.000 x g por mais 2 minutos.

O último passo na extração do RNA é a eluição do mesmo. Para isso, as amostras foram transferidas para um novo tubo e solução de *Elution*® foi adicionado as amostras. Nova centrifugação das amostras a 13,000 x g por 1 minuto.

O RNA purificado foi imediatamente armazenado em freezer -70°C a -80°C até o processamento da amostras pela técnica de *microarray*.

Para extração do RNA das amostras de tecido gengival, o kit escolhido foi *Versagene*TM *RNA Purification Kit* (Gentra Systems®, 2004) para tecido fibroso de até 40 mg (número de catálogo VGR-0050D), protocolo 400135-000.

Resumidamente, para de extração de RNA das células do tecido gengival, as amostras foram homogeneizadas em solução de TCPE® e como o auxílio de um pistilo de plástico esterilizado. Solução de Proteinase K® foi adicionada às amostras e estas vortexadas em alta velocidade por 10 segundos.

As amostras foram então encubadas por 10 minutos em gelo comum (altas temperaturas poderiam degradar o RNA), transferidas para um novo tubo e então centrifugadas por 1 minuto a 400 x g. Nova transferência para um novo tubo, e adição de solução de *Wash*® 1 e centrifugação a 13,000 x g por 1 minuto.

Solução de *DNase*® foi adicionado às amostras que em seguida foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente, e centrifugadas a 13,000-16,000 x g por 2 minutos. As amostras eram então transferidas para um novo tubo e lavadas com solução de *Wash*® 2 e centrifugadas a 13,000 x g por 2 minutos.

Solução de *Elution*® foi pipetada em cada uma das amostras e novamente centrifugadas a 13,000 x g por 1 minuto.

O RNA então purificado, foi imediatamente armazenado em freezer a -80°C freezer até análise por *microarray*.

OBS: Todas as soluções utilizadas para extração de RNA das amostras de sangue e gengiva, podem ser encontradas nos *Kits* utilizados.

3.6-TÉCNICA DO MICROARRAY

Para obtenção de resultados seguros com a tecnologia de *microarray* RNA de boa qualidade é essencial. O RNA deve ser livre de contaminação por proteínas, DNA, ou qualquer outro material como, por exemplo, fenol, etanol ou sais (utilizados para isolar o RNA). O RNA também deve estar intacto e com extensão completa.

Depois da extração de RNA das amostras de sangue e gengiva, a qualidade do RNA foi checada em cada uma das amostras, por meio de eletroforese em gel de agarose. As bandas de RNA deveriam estar intactas e possuir as subunidades 28S e 18S rRNA, e intensidade na proporção de 2:1. O RNA extraído apareceu ao redor de 2-4 kbp num gel desnaturante de agarose.

A concentração e pureza do RNA foram analisadas em todas as amostras por espectrofotômetro UV. Todas as amostras seguiram os seguintes parâmetros:

- ❖ concentração de A260 maior que 11 ng/ μ L de RNA total
- ❖ proporção A260:A280 maior que 2,0
- ❖ proporção A260:A230 maior que 1,7

OBS: Se o RNA de cada amostra não preenchesse todos as especificações acima descritas, a amostra era imediatamente descartada, pois o RNA extraído provavelmente estava degradado.

Depois da avaliação da qualidade e quantidade de RNA o próximo passo foi a análise das amostras por meio da técnica de microarray. Para isso um Oligo GEArray® customizado e focado (número de referência COH-0049, *SuperArray® Bioscience Corporation, Frederick, MD*) foi especialmente desenvolvido para essa pesquisa.

Baseado em pesquisas na literatura, publicações científicas e no nosso entendimento dos fatores ligados à patogênese da doença periodontal, 288 genes relacionados à apoptose, resposta de células T, inflamação e receptores de citocinas foram selecionados para a customização desse *array*, conforme demonstra a tabela 1.

Tabela 1 com os 288 genes escolhidos para esse estudo e relacionados à apoptose (● 99 genes), Th1, Th2, Th3 (● 99 genes) e inflamação e receptores de citocinas (● 90 genes). Dois genes de manutenção(●) também foram incluídos para controle.

| | | | | | |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| ABL1 | CARD6 | TNFSF18 | IL13RA1 | DTX2 | SFTPD |
| AKT1 | CARD8 | TNFSF4 | IL13RA2 | EDG3 | SOCS1 |
| APAF1 | CARD9 | TNFSF7 | IL15 | FOS | SOCS2 |
| ATF2 | CASP1 | TNFSF8 | IL15RA | FOSL1 | NFATC4 |
| BAD | CASP10 | TNFSF9 | IL16 | FOSL2 | NFKB1 |
| BAG1 | CASP14 | TNFRSF1A | IL17 | FOXP3 | NOL3 |
| BAG3 | CASP2 | TNFRSF1B | IL17C | GATA3 | PCGF2 |
| BAG4 | CASP3 | CCL1 | IL17F | GF11 | PF4 |
| BAK1 | CASP4 | CCL15 | IL17R | GLMN | NFATC3 |
| BAX | CASP5 | CCL2 | IL18 | GPR44 | SOCS3 |
| BCL10 | CASP6 | CCL3 | IL18BP | TLR2 | SOCS4 |
| BCL2 | CASP7 | CCL4 | IL18R1 | HES1 | SOCS5 |
| BCL2A1 | CASP8 | CCR1 | IL1A | HRK | SOCS6 |
| BCL2L1 | CASP9 | CCR2 | IL1B | ICEBERG | SOCS7 |
| BCL2L10 | CFLAR | CCR3 | IL1R1 | ICOS | SPP1 |
| BCL2L11 | CIDEA | CCL5 | IL1R2 | CREBBP | STAT1 |
| BCL2L12 | CIDEB | CCL7 | IL1RN | CRP | STAT4 |
| BCL2L13 | CIITA | CCL8 | IL2 | CSF2 | STAT6 |
| BCL2L2 | CRADD | CCR4 | IL20 | INHA | TBX21 |
| BCL3 | DAPK1 | CCR5 | IL21 | INHBA | TFCP2 |
| BCL6 | DAPK2 | CCR6 | IL22 | IRF1 | TGFB3 |
| BCLAF1 | DFFA | CCR7 | IL27 | IRF4 | TH1L |
| BFAR | DFFB | CCR8 | IL2RA | ITGAE | TLR4 |
| BID | FADD | CCR9 | IL2RB | JAG1 | TLR6 |
| BIK | FAS | CEBPB | IL2RG | JAK1 | TMED1 |
| BIRC1 | FASLG | CX3CL1 | IL3 | JAK2 | TP53 |
| BIRC2 | GADD45A | CX3CR1 | IL4 | JAK3 | PUC18 |
| BIRC3 | GDNF | CXCL1 | IL4R | JUN | HSPCB |
| BIRC4 | TNF | CXCL2 | IL5 | JUNB | TP53BP2 |
| BIRC5 | TNFRSF10A | CXCL3 | IL5RA | JUND | TP73 |
| BIRC6 | TNFRSF10B | CXCL5 | IL6 | LAG3 | TP73L |
| BIRC7 | TNFRSF10C | CXCR4 | IL6R | LTA | TRADD |
| BIRC8 | TNFRSF10D | IFNA2 | IL6ST | LTBR | TRAF1 |
| BLR1 | TNFRSF11B | IFNG | IL7 | MAF | TRAF2 |
| BNIP1 | TNFRSF12A | IGF1R | IL8 | MAP2K7 | TRAF3 |
| BNIP2 | TNFRSF14 | IGSF6 | IL8RA | MAPK10 | AS1R2 |
| BNIP3 | TNFRSF18 | IL10 | IL8RB | MAPK8 | AS1R1 |
| BNIP3L | TNFRSF19 | IL10RA | IL9 | MAPK9 | AS1 |
| BOK | TNFRSF21 | IL10RB | IL9R | MCL1 | B2M |
| BRAF | TNFRSF25 | IL11 | CD40LG | NFATC1 | ACTB |
| CARD10 | TNFRSF6B | IL11RA | CD69 | NFATC2 | TRAF4 |
| CARD11 | TNFRSF7 | IL12A | CD80 | PTPRC | XCR1 |
| CARD12 | TNFRSF8 | IL12B | CD86 | PYCARD | YY1 |
| CARD14 | TNFRSF9 | IL12RB1 | CTLA4 | RIPK1 | ZFPM2 |
| CARD15 | TNFSF10 | IL12RB2 | CXCR3 | RIPK2 | BAS2C |
| CARD4 | TNFSF14 | IL13 | DTX1 | SCYE1 | BAS2C |
| GAPDH | RPS27A | | | | |

As sondas ou sequência específica de genes foram imprimidas em um membrana de náilon de 2,5 X 3,8 cm sem contato manual, distribuídas em 12 colunas. Um código de barra seriado único foi impresso em cada membrana, facilitando assim a posterior documentação. As membranas não podem ser reutilizadas e foram imediatamente descartadas após o final desse experimento.

O *array* focado (*array* que analisa mecanismos específicos de uma determinada doença) utilizou genes específicos (oligonucleotídeo de 60 pares de base) para cada gene. Resumidamente as sondas eram selecionados a partir da terminação 3' dos transcritos com base em critérios tais como, guanina-citosina (GC) e temperatura de fusão (T_m).

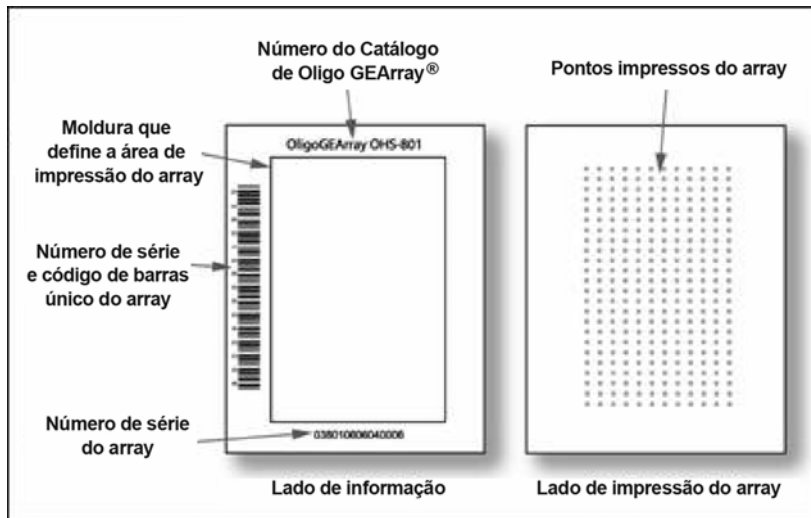
As sequências de 60 pares de base eram então submetidas a um *BLAST* (basic local alignment search tool- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para comparação com todos os transcritos conhecidos e disponíveis no *GenBank*, evitando-se assim seqüências com reatividade cruzada.

As sondas foram desenhadas a partir da terminação 3' e com uma T_m de aproximadamente 92° C e com conteúdo GC de aproximadamente 49%.

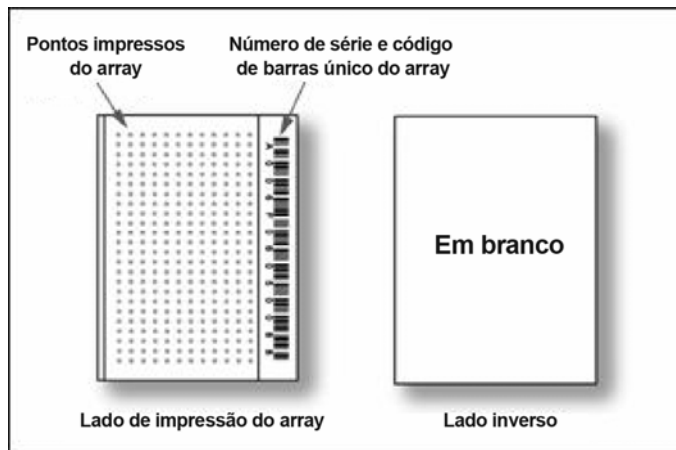
Essas sondas de 60 pares de base foram então sintetizadas pela Qiagen® (Valencia, CA, <http://www1.qiagen.com>). Amostras de sondas oligonucleotídicas liofilizadas foram suspensas e ajustadas para 0,1–10 μ M em água deionizada e fenol vermelho a (0,001%) com o corante de monitoração da qualidade de impressão do *array*. Um *Cartesian SynQuad Prosysdispensor* (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI) foi utilizado para o preparo de 15 μ L de solução de DNA nas membranas (Biodyne B; Pall Bioscience).

Todos os pontos foram distribuídos em uma área retangular de (23 x 35 mm). O diâmetro do ponto era de aproximadamente 0,8 mm e a distância entre os pontos era de 1,125 mm como demonstram as figuras 1 e 2.

Figuras 1 –Esquema representativo das membranas de náilon utilizadas nesse estudo.



Figuras 2 –Esquema representativo das membranas de náilon utilizadas nesse estudo.



Imagens cedidas por Superarray® Bioscience Corporation

Resumo da técnica do microarray (após extração de RNA total) utilizando *Oligo GEMArray® System*:

- 1- Síntese do alvo, ou sonda.
- 2- Hibridização (unir duas fitas de DNA complementar).
- 3- Detecção do resultado por meio de CCD câmera ou filme de raio-x film.
- 4- Análise dos resultados por meio de GEMArray expression Analysis Suite.

Depois da extração do RNA total, a próxima etapa é amplificação e marcação do RNA. Para isso, o kit TrueLabeling-AMP™ 2.0 foi utilizado para marcação e amplificação de RNA anti-sense para hibridização do Oligo GEMArray®.

❖ Preparação do RNA

- ❖ Síntese de cDNA
- ❖ Síntese, labeling e amplificação de cRNA
- ❖ Purificação de cRNA
- ❖ Quantificação e análise da qualidade de cRNA

1-Síntese do alvo, ou sonda.

Essa etapa é subdividida em 3 etapas:

- 1.1-TrueLabeling-AMP S etapa 1: anelamento
- 1.2-TrueLabeling-AMP etapa 2: síntese de cDNA
- 1.3-TrueLabeling-AMP Step 3:síntese de cRNA s,marcação e amplificação

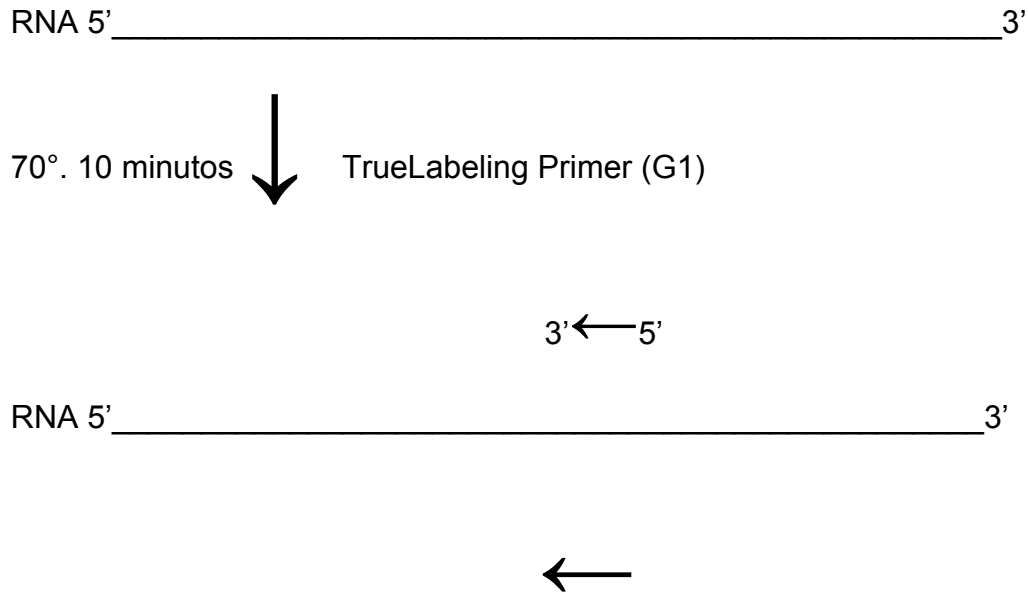
1.1-TrueLabeling-AMP S etapa 1: anelamento

Durante essa etapa ocorre o anelamento dos moldes, que significa a ligação do RNA (por meio de pontes de hidrogênio) a uma sequência complementar, formando uma fita dupla de polinucleotídeos. Para isso, cada amostra de RNA foi transferida para um tubo de microcentrífuga estéril. A tabela 2 mostra os componentes utilizados nessa etapa do procedimento.

Tabela 2. Componentes utilizados para o anelamento.

| | |
|--------------------------|------------------------------|
| RNA | 0.1-3.0 μ de RNA |
| True labeling Primer(G1) | 1 μ |
| Água livre de RNase | Ajuste final para 10 μ l |

O esquema a seguir representa o que ocorreu em cada tubo de microcentrífuga durante a fase de anelamento.



1.2-TrueLabeling-AMP etapa 2: síntese de cDNA

A segunda etapa do procedimento de marcação foi a síntese de DNA complementar (cDNA).

cDNA é um tipo de DNA sintetizado a partir de um molde de RNA. A tabela 3 representa os componentes utilizados para realização dessa etapa.

Tabela 3- Componentes utilizados para a síntese de cDNA.

| | |
|--|-------|
| Tampão de síntese de cDNA (5x concentrado) | 4 µl |
| Água livre de RNase | 4 µl |
| Inibidor de RNase (RI) | 1 µl |
| Enzima para síntese de DNA) | 1 µl |
| Volume final | 10 µl |

O esquema seguinte representa o que ocorre em cada tubo durante a fase de síntese de cDNA:

RNA 5' _____ 3'

42c. 50 min; 75° 5 min ↓ G2. G3. RI

cDNA _____

1.3-TrueLabeling-AMP Step 3:síntese de cRNA, marcação e amplificação.

Nessa etapa RNA complementar (cRNA) é sintetizado a partir de cDNA.
Tabela 4 representa os componentes requeridos para síntese de cRNA.

Table 4. Componentes para síntese de cRNA.

| | |
|--|-----|
| Tampão de polimerase de RNA concentrado 2,5x | 16μ |
| Biotin-UTP | 2μ |
| Enzima polymerase de RNA | 2μ |
| Volume final | 20μ |

cDNA _____

37°. 1 h . ↓ G24. G25. Biotin UTP

3' _____ 5'

cRNA target ArrayGrade™ CRNA cleanup Kit

Fase de pré-hibridização

Na pré-hibridização, cada membrana de náilon foi embebida em 5 mL de água destilada por 5 minutos. A seguir a água foi descartada, e 2 mL de solução de hibridização *Hybridization® Solution* foi adicionada a cada uma das membranas.

As membranas foram então colocadas em um agitador térmico (60 °C) por aproximadamente 2 horas, com velocidade de agitação lenta e contínua.

2-Fase de hibridização

Hibridização é o processo de combinação de uma fita simples de ácido nucléicos com outra, formando uma fita dupla. Primeiramente solução de TrueLabeling®-AMP foi adicionada a 0,75 mL de solução para hibridização *Hybridization® Solution* pré-aquecida a 60°C. A seguir o volume final de solução de hibridização foi adicionado ao recipiente de hibridização. As membranas foram então incubadas num agitador térmico (60 °C) durante a noite, com velocidade de agitação lenta e contínua.

As membranas foram embebidas por 15 minutos em solução de 2X SSC. 1% SDS aquecida a 60°C, e depois novamente e depois com solução de 0.1 X SSC/1% (60°C) por 15 minutos.

3-Detecção do resultado por meio de câmera Polaroid® ou filme de raio-x

Para detecção dos resultados (técnica de quimiluminescência) realizou-se nova incubação das membranas com solução de solução de AP-AS por 10 minutos. A seguir, as membranas foram lavadas 4 vezes com 4 ml de 1x Buffer F®, enxaguadas 2 vezes com 3 ml de Buffer G®, e novamente incubadas com 1 ml de solução CDP-Star®.

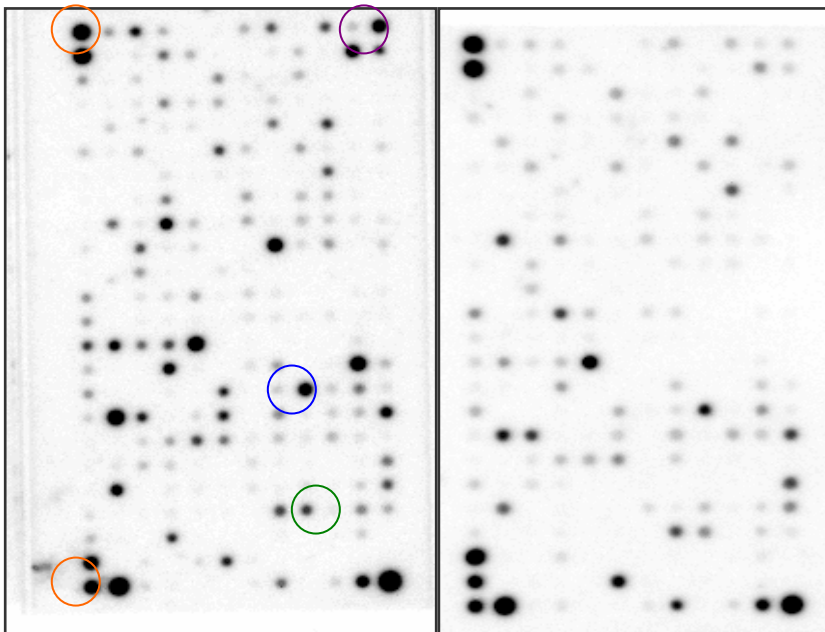
4-Aquisição de imagem

Nesse estudo, as imagens foram então captadas por meio de filme radiográfico panorâmico (Kodak®) e de um cassete. Após as membranas terem sido “radiografadas”, eram reveladas seguindo o protocolo da Serviço de Radiologia da *University of Southern Califórnia*. As imagens eram então escaneadas por um *scanner* convencional (Hewlett-Packard®) e salvas no formato *TIFF image*.

As fotos 4 a 11 a seguir mostram o resultado da análise genética de alguns pacientes do grupo experimental e controle.

AMOSTRAS DE TECIDO GENGIVAL

Fotos 4 e 5- array de dois pacientes do grupo experimental (PERIODONTITE)



Paciente 1

Paciente 2

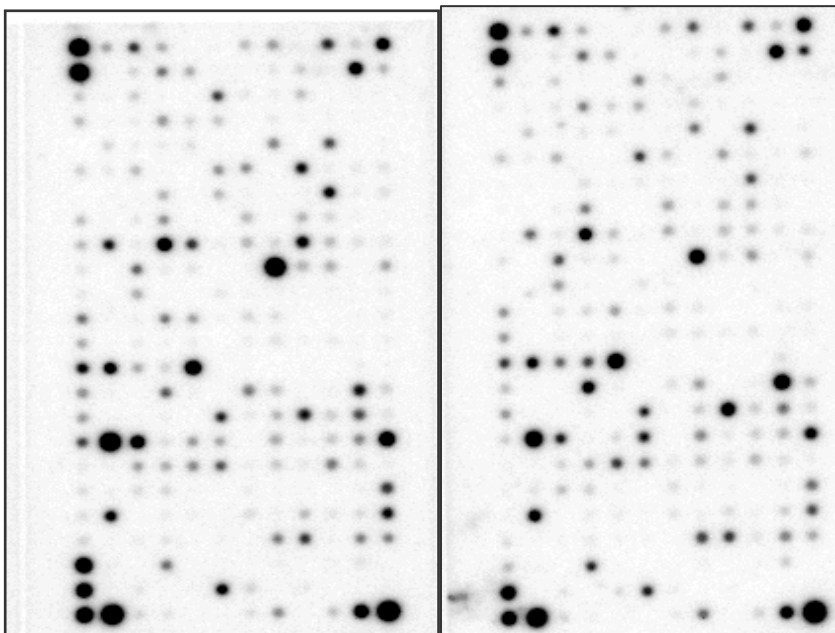
Genes de manutenção (RPS27A, GAPDH) ●

BAG3 (apoptose) ●

IL-6 ●

NAFTC1 ●

Foto 6 e 7 do array de dois pacientes do grupo controle (SEM DOENÇA PERIODONTAL)

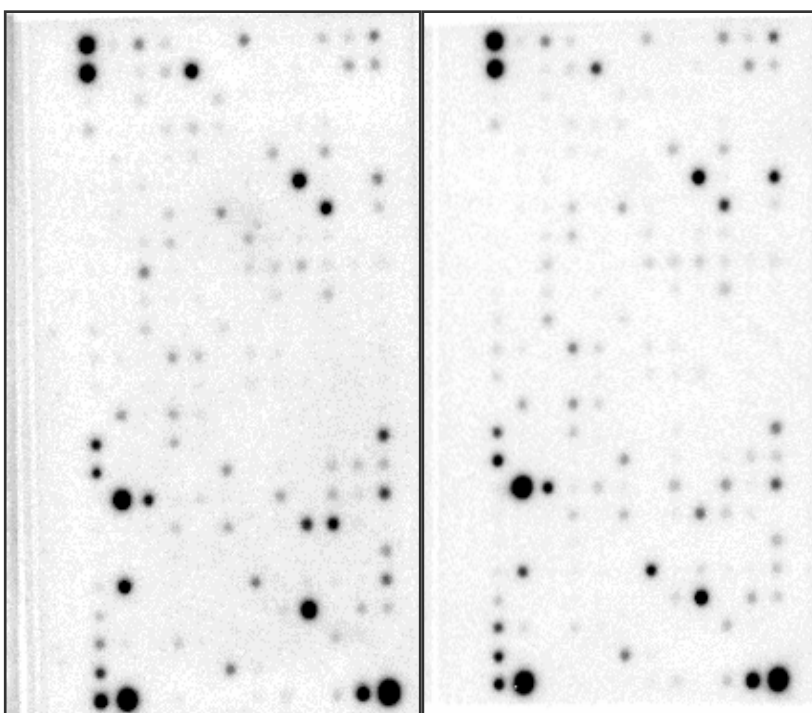


Paciente 3

Paciente 4

AMOSTRAS DE SANGUE

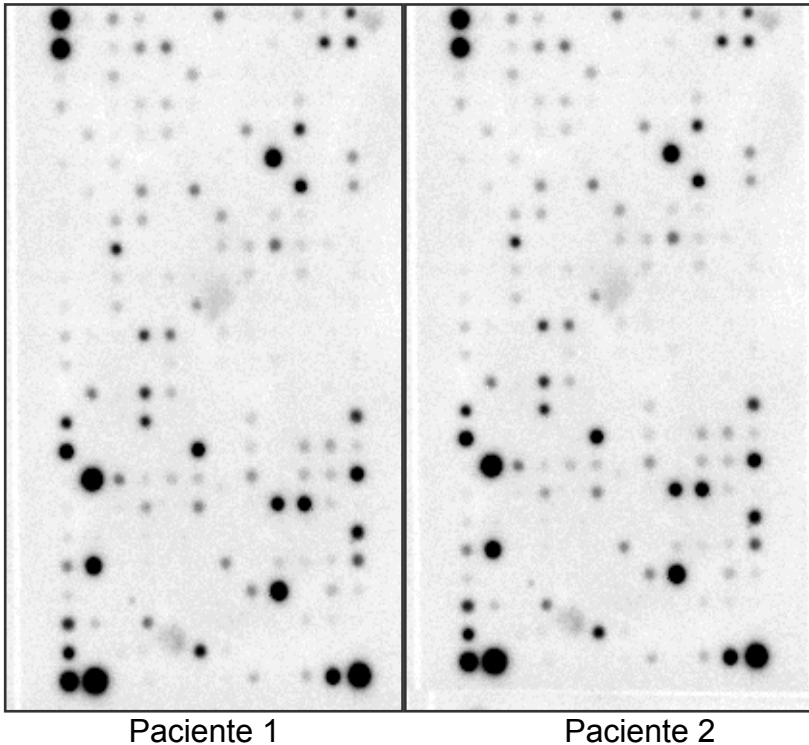
Foto 8 e 9 do array de 2 pacientes do grupo experimental (PERIODONTITE)



Paciente 1

Paciente 2

Fotos 10 e 11 do array de dois pacientes do grupo controle (SEM DOENÇA PERIODONTAL)



5- Análise dos dados

As imagens foram analisadas por meio de um programa específico para análise de *microarray* (GEArray Expression Analysis Suite®). A leitura era realizada em cada ponto do array e um valor era gerado de acordo com a densidade detectada em cada ponto (conversão da imagem em números). A seguir, cada imagem era normalizada com base no valor dos genes de manutenção. Os valores eram automaticamente transferidos para tabelas no programa Excel para serem posteriormente analisadas.

VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS PCR EM TEMPO REAL

Uma das maiores críticas e desvantagens dos *arrays* de hibridização é a análise de muitos genes ao mesmo tempo, gerando um grande volume de dados . Alguns genes podem estar alterados “*by chance*”. Para compensar a falta de um grande número de pacientes, devido ao elevado custo dos experimentos com

microarray, os resultados devem ser validados por outra técnica de análise de expressão genética, como *PCR* em tempo real (*RT-PCR*).

Transcrição reversa combinada com reação em cadeia da polimerase tem provado ser uma poderosa ferramenta não quantificação da expressão genética (MURPHY, 1990; HIROSHI *et al.*, 1992). Os genes que demonstraram alterações em sua expressão e após critérios de escolha (veja discussão a seguir) foram validados por *PCR* em tempo real (*RT-PCR*).

TRANSCRIÇÃO REVERSA E SÍNTESE DE FITA SIMPLES DE DNA

Quantidades iguais de RNA (aproximadamente 500 ng) foram obtidas de todas as amostras e submetidas à transcrição reversa (Superarray™ RT2 PCR array first strand synthesis kit C-02). O kit escolhido utiliza transcriptase reversa e a combinação de primers e oligo dT primers.

PCR EM TEMPO REAL

Para as reações de PCR foi utilizado o kit Applied Biosystems 7500 Fast using com SYBR green (PA-012). O volume total da reação foi de 20 µL. Os parâmetros do termociclador foi de 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Alterações relativas na expressão genética foram calculadas por meio de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ método do ciclo limiar. Primeiramente é calculada a média dos valores das réplicas (nesse experimento as amostras foram feitas em triplicata). Em seguida calculou-se o $\Delta\Delta Ct$. Esse método primeiramente subtrai o número de ciclos (Ct) de um gene do número de Ct do gene GAPDH (gene de manutenção), num processo denominado de normalização dos resultados. Posteriormente, foi calculado o valor $\Delta\Delta Ct$, que significa subtrair o Ct de um gene normalizado do grupo experimental (neste caso os pacientes periodontais) do Ct do mesmo gene no grupo controle (pacientes saudáveis periodontalmente). Calcula-se então a média de cada gene no grupo experimental e no grupo controle e calcula-se o valor do nível de expressão

pela fórmula $2^{-\text{valor do gene}}$. Obtendo assim o valor da alteração na expressão genética.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1-CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES ESTUDADOS

As características clínicas dos pacientes selecionados para essa pesquisa estão demonstradas na tabela 4. Os pacientes foram divididos em dois diferentes grupos. O grupo teste (PC) foi composto por 10 indivíduos; 6 caucasianos e 4 latinos. O grupo controle era composto por 4 indivíduos; e 2 caucasianos e 2 latinos.

O grupo PC foi composto por 8 pacientes do sexo masculino e 2 pacientes do sexo feminino, com idade média de 56 ($\pm 2,1$) anos. Já o grupo NP foi composto por 4 pacientes do sexo masculino, com idade média de 42,7 ($\pm 17,0$).

Tabela 4. Características clínicas dos pacientes estudados

| | Idade Média (\pm SD) | Gênero (M/F) | Média da PS (\pm SD) | Média PI (\pm SD) | Média PO (\pm SD) |
|---|----------------------------|-----------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Pacientes Periodontais Crônicos(PC) N=10 | 56,0 ($\pm 2,1$) | 8 M/ 2F | 5,2mm ($\pm 1,4$) | 5,6 mm($\pm 1,8$) | 6,1mm ($\pm 2,3$) |
| Pacientes- Periodontalmente Saudáveis (NP) N=4 | 42,7 (17,0) | 4 M/0F | 2,6 mm($\pm 0,3$) | 0 | 0 |

* PF-profundidade de sondagem; PI.-perda de inserção; PO- perda óssea

A média da PS no grupo PC foi de 5,2 ($\pm 1,4$), enquanto que média da PS no grupo NP foi de 2,6 ($\pm 0,3$). A média da perda de inserção e da perda óssea no grupo PC foi de 5,6 ($\pm 1,8$) e 6,1mm ($\pm 2,3$) respectivamente, enquanto que no grupo NP nenhum sítio apresentou perda óssea ou de inserção.

Todas as amostras gengivais do grupo PC foram obtidas de sítios com sangramento positivo a sondagem. Já no grupo NP detectou-se sangramento a sondagem em nenhum dos sítios.

4.2-ANÁLISE DA EXPRESSÃO GENÉTICA PELA TÉCNICA DO MICROARRAY

Um total de 288 genes foram escolhidos para construção de um *array* relacionado aos seguintes mecanismos: apoptose, resposta de células T e genes relacionados a mediadores inflamatórios, citocinas e seus receptores.

Entre esses genes, 99 relacionavam-se a genes que desempenham um importante papel na regulação do mecanismo de apoptose, tais como ligantes chave, receptores, moduladores intra-celulares, fatores envolvidos no processo de transcrição. Outros genes relacionados à apoptose representam vias chaves em transdução de sinais e resposta ao estresse que iniciam ou propagam a apoptose.

Para análise da resposta de células T, 99 genes relacionados as quatro classe de linfócitos T auxiliares (linfócitos T CD4+): Th1, Th2, Th3 e células T regulatórias foram avaliados. Esses genes incluíram genes relacionados à citocinas representativas das populações de células T, fatores de transcrição que regulam essas citocinas, marcadores de linfócitos CD4+, genes envolvidos na ativação da resposta imune das células T e na resposta humoral antimicrobiana, além de outros genes relacionados a resposta imune.

Os 90 genes remanescentes eram relacionados a quimiocinas, interleucinas e ligantes de TNF mediadores das reações da cascata imune durante os processos inflamatórios. Dois genes de manutenção foram também incluídos no *array*.

Todos genes citados, investigaram a hipótese central dessa pesquisa, como pode-se observar na tabela1 (seção Material e Métodos).

Depois da realização do procedimento de microarray, todas as imagens foram scaneadas e salvas como um arquivo eletrônico em escala de cinza, 16 *bit TIFF file* format. Para análise dos dados, as imagens foram submetidas a um programa de

computador *on line*, especialmente desenhado e fornecido pela companhia (GEArray® *Expression Analysis Suit*). Para cada espécime, a expressão genética foi quantificada por meio da densidade dos pontos presentes nas membranas do *microarray*.

Os resultados obtidos das amostras de sangue e tecido gengival foram distribuídos em dois grupos: grupo experimental, composto por sangue e tecido gengival dos pacientes com periodontite crônica; e grupo controle composto por sangue e gengiva de pacientes periodontalmente saudáveis.

Todos os resultados foram normalizados, subtraindo-se do valor mínimo do “background” e normalização interquartil.

Valor mínimo é o menor densidade detectada no ponto presente no array e a média dos pontos como valor de correção de background, e é subtraído do valor de intensidade de cada ponto do array.

Interquartil utiliza genes entre 25% e 75% quartil e a o valor de intensidade média desses pontos é usada para normalização de todos os genes. Para esse propósito, o valor de manutenção de cada gene é dividido pela média do valor de intensidade. Os genes de manutenção ou outros genes não foram utilizados para normalização. A média e o desvio padrão do valor da intensidades normalizadas obtida das amostras de todos os pacientes de ambos os grupos (experimental e controle) foram utilizadas para calcular alterações no nível de expressão (entre as amostras do grupo experimental e controle).

O teste t bicaudal foi utilizado para calcular o valor de P. Para que o resultado fosse considerado estatisticamente significativo, o valor de P deveria ser $\leq 0,05$.

Como primeira análise a expressão genética das amostras gengivais de cada paciente dos grupos experimental e controle foi comparada com a expressão genética das amostras de sangue respectiva. Em adição, o resultado das amostras de gengiva e sangue dos pacientes do grupo experimental foram comparadas com o resultado das amostras de sangue e gengiva do grupo controle. O log 2 da razão dos espécimes normalizados para cada uma dessas comparações também foi calculado. A significância dessa comparação foi calculada pelo teste t bicaudal, e o valor de $p \leq 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. Além disso, para determinar a significância biológica a diferença de 2 vezes na expressão do gene foi utilizada.

Portanto, a comparação da expressão genética com valor de $\log_2 \leq -1$ foi considerada como baixa expressão, e aquela que demonstrou um valor de $\log_2 \geq 1$, foi considerada como elevada expressão.

Nos indivíduos do grupo controle (NP), quando as amostras de gengiva e sangue foram comparadas, 75 genes foram considerados estatisticamente significantes. Desse total, 40 genes estavam com baixa expressão e 35 com elevada expressão. A tabela 6 demonstra os dados do microarray obtidos da comparação das amostras gengivais e de sangue dos pacientes do grupo controle.

TABELA 6. Expressão genética da comparação de tecido gengival e sangue nos pacientes do grupo NP. A média (\pm DP) dos níveis de expressão dos genes obtidas de ambas as amostras (gengiva e sangue), assim como a razão e Log_2 da expressão tecido gengival versus sangue, estão demonstradas abaixo. Valores de \log_2 abaixo de -1 foram considerado como expressão genética diminuída e acima de +1 como expressão genética aumentada. O valor de p da foi calculado pelo teste t bicaudal (página seguinte).

| GENE | MÉDIA (\pm SD) SANGUE(S) | MÉDIA (\pm DP) NP | Log ₂ PC:NP | Expressão | Valor de P |
|--------------------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|---------------|
| PF4 | 13,16(\pm 3,38) | 0,91(\pm 0,43) | -3,89 | Expressão diminuída | 0,0005 |
| CD40LG | 3,31(\pm 0,93) | 0,25(\pm 0,04) | -3,71 | | 0,0010 |
| CCR3 | 2,30(\pm 1,25) | 0,19(\pm 0,07) | -3,62 | | 0,05 |
| CX3CR1 | 8,85 (\pm 0,70) | 0,87(\pm 0,14) | -3,35 | | 0,000001 |
| TLR4 | 8,64(\pm 4,67) | 1,00(\pm 0,29) | -3,11 | | 0,05 |
| CCL5 | 36,64(\pm 9,77) | 4,49(\pm 1,13) | -3,03 | | 0,0010 |
| CCR7 | 5,71(\pm 1,02) | 0,82(\pm 0,36) | -2,80 | | 0,0000 |
| PTPRC | 17,48(\pm 3,45) | 2,73(\pm 0,85) | -2,68 | | 0,0005 |
| TNFRSF1B | 44,3(\pm 9,43) | 7,05(\pm 2,21) | -2,66 | | 0,0005 |
| IGSF6 | 1,04(\pm 0,28) | 0,17(\pm 0,06) | -2,66 | | 0,0010 |
| CARD12 | 1,26(\pm 0,32) | 0,20(\pm 0,13) | -2,64 | | 0,0010 |
| TNFSF9 | 1,97(\pm 1,16) | 0,32(\pm 0,10) | -2,64 | | 0,05 |
| AS1 | 3,84(\pm 2,17) | 0,71(\pm 0,18) | -2,45 | | 0,05 |
| STAT4 | 3,73(\pm 1,36) | 0,69(\pm 0,26) | -2,44 | | 0,005 |
| GATA3 | 1,51(\pm 0,69) | 0,28(\pm 0,17) | -2,42 | | 0,05 |
| CCR1 | 5,04(\pm 1,56) | 0,96 (\pm 0,47) | -2,40 | | 0,005 |
| CD86 | 2,30(\pm 0,41) | 0,46(\pm 0,16) | -2,31 | | 0,0005 |
| IL10RA | 7,90(\pm 2,20) | 1,64(\pm 0,71) | -2,27 | | 0,005 |
| IL8RA | 10,18(\pm 3,19) | 2,16(\pm 0,64) | -2,24 | | 0,005 |
| CXCR3 | 2,84(\pm 0,59) | 0,61(\pm 0,27) | -2,23 | | 0,0005 |
| TLR2 | 3,24(\pm 1,27) | 0,73(\pm 0,20) | -2,16 | | 0,010 |
| TNFRSF8 | 1,91(\pm 0,24) | 0,45(\pm 0,07) | -2,10 | | 0,00005 |
| IL2RG | 15,21(\pm 4,86) | 3,91(\pm 2,85) | -1,96 | | 0,010 |
| IL8RB | 25,50(\pm 9,07) | 6,80(\pm 2,53) | -1,91 | | 0,010 |
| CXCR4 | 6,74(\pm 0,98) | 1,83(\pm 0,79) | -1,88 | | 0,0005 |
| BLR1 | 3,43(\pm 1,42) | 0,93(\pm 0,99) | -1,88 | | 0,05 |
| IL5RA | 0,47(\pm 0,17) | 0,15(\pm 0,04) | -1,70 | | 0,010 |
| CCR5 | 5,30(\pm 1,57) | 1,67(\pm 1,11) | -1,67 | | 0,010 |
| IL18R1 | 0,65(\pm 0,22) | 0,24(\pm 0,09) | -1,43 | | 0,05 |
| TNFRSF19 | 0,49(\pm 0,14) | 0,20(\pm 0,09) | -1,31 | | 0,05 |
| IL18BP | 0,42(\pm 0,10) | 0,17(\pm 0,09) | -1,30 | | 0,05 |

| | | | | | |
|--------------------------|--------------|--------------|-------|----------------------------|----------------------------|
| TNF | 1,16(±0,31) | 0,48(±0,18) | -1,29 | Expressão diminuída | 0,010 |
| CD4 | 24,64(±6,50) | 10,37(±2,70) | -1,25 | | 0,010 |
| CCL7 | 1,43(±0,49) | 0,63(±0,28) | -1,19 | | 0,05 |
| TRAF5 | 1,25(±0,24) | 0,57(±0,20) | -1,17 | | 0,005 |
| LTA | 2,91(±0,41) | 1,33(±0,37) | -1,12 | | 0,005 |
| TNFRSF14 | 0,54(±0,17) | 0,25(±0,06) | -1,10 | | 0,05 |
| MAPK8 | 3,74(±1,46) | 1,78(±0,28) | -1,07 | | 0,05 |
| JAK3 | 2,74(±0,64) | 1,33(±0,20) | -1,05 | | 0,010 |
| LAG3 | 1,30(±0,32) | 0,56(±0,30) | -1,0 | | 0,05 |
| BNIP2 | 0,46(±0,05) | 0,92(±0,14) | 1,01 | | Expressão aumentada |
| CASP9 | 1,48(±0,35) | 3,04(±0,84) | 1,04 | 0,05 | |
| SOCS4 | 0,56(±0,14) | 1,17(±0,25) | 1,07 | 0,010 | |
| BIRC2 | 2,89(±0,15) | 6,39(±1,29) | 1,14 | 0,005 | |
| CRADD | 1,45(±0,09) | 3,28(±0,75) | 1,18 | 0,005 | |
| HSPCB | 19,37(±4,82) | 44,53(±9,88) | 1,20 | 0,005 | |
| IL10 | 0,53(±0,12) | 1,23(±0,31) | 1,22 | 0,010 | |
| BCL2L13 | 1,11(±0,28) | 2,79(±1,25) | 1,33 | 0,05 | |
| YY1 | 2,78(±0,42) | 7,21(±0,96) | 1,38 | 0,0000 | |
| BOK | 1,37(±0,57) | 3,64(±0,48) | 1,41 | 0,0010 | |
| TNFRSF1A | 3,91(±0,84) | 11,23(±2,54) | 1,52 | 0,005 | |
| IL4R | 5,80(±2,12) | 16,59(±3,72) | 1,52 | 0,005 | |
| PCGF2 | 0,88(±0,25) | 2,62(±0,33) | 1,57 | 0,0005 | |
| BCL3 | 7,26(±1,52) | 21,64(±4,34) | 1,57 | 0,0010 | |
| IL13RA1 | 1,87(±0,83) | 5,64(±1,10) | 1,59 | 0,005 | |
| GADD45A | 0,65(±0,08) | 1,97(±0,56) | 1,59 | 0,005 | |
| BCLAF1 | 1,60(±0,65) | 5,12(±0,94) | 1,68 | 0,0010 | |
| GAPDH | 8,67(±2,31) | 29,73(±7,59) | 1,78 | 0,005 | |
| TNFSF10 | 3,87(±1,41) | 13,29(±4,10) | 1,78 | 0,005 | |
| CASP7 | 0,59(±0,30) | 2,15(±0,58) | 1,88 | 0,005 | |
| SFTPD | 0,66(±0,10) | 2,66(±0,60) | 2,02 | 0,0010 | |
| IL6R | 0,97(±0,56) | 4,42(±0,86) | 2,18 | 0,0005 | |
| LTBR | 1,77(±0,65) | 8,06(±2,22) | 2,19 | 0,005 | |
| BIRC5 | 0,57(±0,12) | 2,80(±0,46) | 2,30 | 0,0001 | |
| DTX2 | 1,81(±0,69) | 11,06(±1,95) | 2,61 | 0,0001 | |

| | | | | | |
|---------------------------|----------------|----------------|-------|----------------------------|--------------------------------------|
| IL1R1 | 0,84(±0,26) | 5,92(± 1,33) | 2,81 | Expressão-aumentada | 0,0005 |
| CARD10 | 0,21(±0,18) | 1,86(±0,77) | 3,13 | | 0,010 |
| NFATC4 | 0,67(±0,20) | 5,96(±3,09) | 3,16 | | 0,05 |
| CCL2 | 0,50(±0,17) | 5,31(±2,69) | 3,42 | | 0,05 |
| BAG3 | 0,67(±0,17) | 8,08(±2,55) | 3,59 | | 0,005 |
| IL1RN | 2,13(±0,53) | 57,17(±16,49) | 4,74 | | 0,0005 |
| CXCL1 | 0,52(±0,23) | 18,09(±14,2)0 | 5,13 | | 0,05 |
| IL1A | 0,23(±0,16) | 9,20(±2,65) | 5,31 | | 0,0005 |
| JAG1 | 0,54(±0,20) | 24,73(±4,49) | 5,51 | | 0,00005 |
| CX3CL1 | 0,27(±0,12) | 12,99(±8,29) | 5,58 | | 0,05 |
| ITGAE | 1,32(±0,24) | 2,38(±0,20) | 0,85 | | Estatisticamente-significante |
| BAK1 | 4,11(±1,11) | 7,81(±1,20) | 0,93 | 0,005 | |
| BAS2C | 3,48(±0,63) | 1,88(±0,11) | -0,89 | 0,005 | |
| CASP1 | 1,71(±0,21) | 0,94(±0,17) | -0,86 | 0,005 | |
| CXCL5 | 2,15(±0,22) | 4,01(±0,81) | 0,90 | 0,005 | |
| BAS2C | 37,34(±7,55) | 22,59(±1,68) | -0,73 | 0,010 | |
| IGF1R | 2,58(±0,61) | 5,12(±1,21) | 0,99 | 0,010 | |
| JUN | 1,31(±0,15) | 1,82(±0,21) | 0,48 | 0,010 | |
| MAP2K7 | 3,99(±0,33) | 5,29(±0,53) | 0,41 | 0,010 | |
| MAPK9 | 2,08(±0,36) | 3,66(±0,64) | 0,81 | 0,010 | |
| ABL1 | 2,56(±1,01) | 5,09(±1,44) | 0,99 | 0,05 | |
| BAS2C | 168,84(±19,41) | 114,01(±28,58) | -0,57 | 0,05 | |
| IL16 | 1,11(±0,19) | 0,72(±0,10) | -0,63 | 0,05 | |
| JUNB | 107,99(±28,48) | 59,69(±4,69) | -0,86 | 0,05 | |
| NFKB1 | 5,76(±0,86) | 8,04(±1,46) | 0,48 | 0,05 | |
| NOL3 | 0,45(±0,15) | 0,89(±0,27) | 0,98 | 0,05 | |
| TMED1 | 2,43(±0,22) | 1,69(±0,51) | -0,52 | 0,05 | |
| TNFRSF10A | 0,99(±0,40) | 1,88(±0,28) | 0,93 | 0,05 | |
| TNFRSF10C | 2,96(±1,08) | 1,53(±0,40) | -0,96 | 0,05 | |
| CCR4 | 0,43(±0,22) | 0,16(±0,10) | -1,41 | NS | |
| SOCS7 | 0,44(±0,29) | 0,16(±0,05) | -1,44 | NS | |
| IL4 | 0,50(±0,30) | 0,18(±0,05) | -1,48 | NS | |
| AS1R2 | 0,29(±0,16) | 0,13(±0,08) | -1,14 | NS | |
| CASP3 | 0,68(±0,27) | 0,31(±0,31) | -1,14 | NS | |

| | | | | | |
|-------------------------|----------------|----------------|-------|--|----|
| BCL10 | 1,47(±0,80) | 0,69(±0,30) | -1,10 | | NS |
| ACTB | 172,46(±29,34) | 128,52(±28,54) | -0,42 | | NS |
| AKT1 | 10,21(±7,12) | 13,89(±4,91) | 0,44 | | NS |
| APAF1 | 3,48(±2,41) | 3,25(±0,88) | -0,10 | | NS |
| B2M | 60,31(±9,62) | 47,39(±8,32) | -0,35 | | NS |
| BAD | 0,39(±0,14) | 0,44(±0,16) | 0,25 | | NS |
| BAG1 | 6,17(±2,77) | 3,91(±1,08) | -0,66 | | NS |
| BAG4 | 0,54(±0,10) | 0,39(±0,19) | -0,48 | | NS |
| BAX | 2,44(±0,94) | 2,63(±0,63) | 0,11 | | NS |
| BCL2 | 2,03(±0,67) | 1,17(±0,33) | -0,79 | | NS |
| BCL2A1 | 3,84(±0,72) | 4,32(±1,73) | 0,17 | | NS |
| BCL2L1 | 9,52(±4,35) | 3,95(±1,56) | -1,27 | | NS |
| BCL2L12 | 0,29(±0,28) | 0,68(±0,17) | 0,29 | | NS |
| BCL2L2 | 0,55(±0,20) | 0,47(±0,15) | -0,23 | | NS |
| BCL6 | 5,54(±2,49) | 5,60(±3,16) | 0,01 | | NS |
| BFAR | 0,41(±0,18) | 0,44(±0,06) | 0,09 | | NS |
| BID | 2,54(±0,49) | 2,01(±0,41) | -0,34 | | NS |
| BIK | 0,42(±0,19) | 0,33(±0,08) | -0,27 | | NS |
| BIRC1 | 0,37(±0,08) | 0,32(±0,20) | -0,21 | | NS |
| BIRC3 | 0,66(±0,28) | 0,83(±0,20) | 0,35 | | NS |
| BIRC4 | 0,58(±0,14) | 0,39(±0,15v) | -0,56 | | NS |
| BIRC6 | 0,39(±0,12) | 0,21(±0,10) | -0,86 | | NS |
| BIRC7 | 0,40(±0,35) | 0,18(±0,07) | -1,15 | | NS |
| BIRC8 | 0,45(±0,09) | 0,35(±0,15) | 0,29 | | NS |
| BNIP3 | 2,09(±0,46) | 10,40(±7,39) | 2,31 | | NS |
| BNIP3L | 1,65(±0,60) | 3,05(±1,78) | 0,89 | | NS |
| BRAF | 0,16(±0,16) | 0,34(±0,26) | 1,04 | | NS |
| CARD11 | 0,44(±0,20) | 0,45(±0,21) | 0,02 | | NS |
| CARD14 | 0,56(±0,20) | 0,19(±0,05) | -0,49 | | NS |
| CARD15 | 0,20(±0,07) | 0,13(±0,10) | -0,63 | | NS |
| CARD4 | 0,10(±0,09) | 0,09(±0,05) | -0,15 | | NS |
| CARD6 | 1,40(±0,55) | 2,86(±1,26) | 1,04 | | NS |
| CARD8 | 0,45(±0,20) | 0,54(±0,45) | 0,27 | | NS |
| CARD9 | 1,03(±0,17) | 0,81(±0,24) | -0,35 | | NS |

| | | | | | |
|------------------------|-------------|---------------|-------|-----------------------------|----|
| CASP10 | 0,24(±0,07) | 0,18(±0,09) | -0,25 | Não Significante | NS |
| CASP14 | 0,12(±0,17) | 0,23(±0,07) | 0,94 | | NS |
| CASP2 | 4,94(±1,22) | 6,32(±2,74) | 0,35 | | NS |
| CASP4 | 6,61(±1,50) | 8,28(±2,16) | 0,33 | | NS |
| CASP5 | 0,24(±0,16) | 0,15(±0,10) | -0,62 | | NS |
| CASP6 | 0,26(±0,08) | 0,40(±0,20) | 0,32 | | NS |
| CASP8 | 0,49(±0,16) | 0,50(±0,06) | 0,03 | | NS |
| CCL1 | 0,17(±0,14) | 0,18(±0,09) | 0,08 | | NS |
| CCL15 | 0,51(±0,09) | 0,19(±0,14) | -0,33 | | NS |
| CCL3 | 0,63(±0,17) | 1,03(±0,70) | 0,72 | | NS |
| CCL4 | 0,31(±0,07) | 0,17(±0,13) | -0,90 | | NS |
| CCL8 | 0,32(±0,16) | 0,32(±0,10) | -0,27 | | NS |
| CCR8 | 0,53(±0,15) | 0,46(±0,33) | -0,21 | | NS |
| CEBPB | 4,22(±1,93) | 4,89(±1,20) | 0,21 | | NS |
| CIDEA | 0,38(±0,09) | 0,59(±1,05) | 0,63 | | NS |
| CIDEB | 0,39(±0,45) | 4,59(±1,19) | 0,15 | | NS |
| CREBBP | 2,19(±1,21) | 2,90(±1,31) | 0,40 | | NS |
| CRP | 0,47(±0,21) | 0,37(±0,10) | -0,36 | | NS |
| CTLA4 | 0,45(±0,16) | 0,30(±0,36) | -0,59 | | NS |
| CXCL2 | 0,35(±0,06) | 1,27(±1,02) | 1,86 | | NS |
| DAPK1 | 2,05(±0,54) | 2,56(±0,47) | 0,32 | | NS |
| DAPK2 | 0,92(±0,08) | 1,10(±0,34) | 0,26 | | NS |
| DFFA | 0,87(±0,41) | 0,77(±0,16) | -0,18 | | NS |
| DFFB | 0,63(±0,15) | 0,97(±0,30) | 0,62 | | NS |
| EDG3 | 1,06(±0,63) | 0,57(±0,24) | -0,90 | | NS |
| FADD | 1,25(±0,17) | 1,55(±0,44) | 0,31 | | NS |
| FOS | 1,86(±0,49) | 14,87(±13,27) | 3,00 | | NS |
| FOSL1 | 0,46(±0,09) | 1,34(±0,80) | 1,54 | | NS |
| FOSL2 | 3,26(±1,01) | 4,52(±1,39) | 0,47 | | NS |
| GDNF | 0,38(±0,20) | 0,31(±0,35) | -0,31 | | NS |
| GFI1 | 5,42(±2,62) | 5,40(±1,48) | -0,01 | | NS |
| HRK | 0,32(±0,22) | 0,16(±0,03) | -1,05 | NS | |
| IL10RB | 4,17(±1,03) | 4,33(±0,97) | 0,05 | NS | |
| IL11 | 0,31(±0,17) | 0,35(±0,11) | 0,20 | NS | |

| | | | | | |
|----------|---------------|---------------|-------|---------------------|----|
| IL11RA | 1,53(±0,56) | 1,44(±0,39) | -0,09 | Não Significante | NS |
| IL12A | 0,94(±0,19) | 0,94(±0,12) | 0,00 | | NS |
| IL12RB2 | 0,32(±0,12) | 0,48(±0,16) | 0,58 | | NS |
| IL15 | 0,56(±0,17) | 0,51(±0,16) | -0,13 | | NS |
| IL15RA | 4,14(±0,08) | 0,49(±0,17) | 0,22 | | NS |
| IL17C | 1,01(±0,41) | 0,89(±0,40) | -0,18 | | NS |
| IL17F | 0,57(±0,21) | 0,91(±0,27) | 0,66 | | NS |
| IL18 | 0,36(±0,07) | 1,49(±1,13) | 2,05 | | NS |
| IL1B | 8,60(±2,88) | 12,69(±2,37) | 0,56 | | NS |
| IL1R2 | 7,96(±4,91) | 4,70(±3,33) | -0,76 | | NS |
| IL2 | 0,33(±0,16) | 0,44(±0,11) | 0,43 | | NS |
| IL21 | 0,15(±0,10) | 0,07(±0,04) | -1,18 | | NS |
| IL2RA | 0,53(±0,24) | 1,04(±0,34) | 0,98 | | NS |
| IL5 | 0,73(±0,10) | 0,61(±0,08) | -0,27 | | NS |
| IL6 | 0,32(±0,19) | 0,40(±0,45) | 0,31 | | NS |
| IL6ST | 0,37(±0,17) | 0,22(±0,04) | -0,76 | | NS |
| IL7 | 0,44(±0,17) | 0,46(±0,13) | 0,08 | | NS |
| IL8 | 0,57(±0,23) | 12,34(±18,33) | 4,44 | | NS |
| IL9 | 1,57(±0,97) | 0,41(±0,04) | -1,95 | | NS |
| IRF1 | 12,29(±6,12) | 7,02(±2,41) | -0,81 | | NS |
| JAK1 | 3,03(±0,79) | 2,51(±0,23) | -0,27 | | NS |
| JAK2 | 3,45(±0,19) | 8,58(±4,30) | 1,31 | | NS |
| JUND | 15,33(±7,34) | 15,68(±3,05) | 0,03 | | NS |
| MAPK10 | 0,49(±0,18) | 0,79(±0,24) | 0,70 | | NS |
| MCL1 | 16,49(±3,09) | 12,80(±2,46) | -0,37 | | NS |
| NFATC2 | 0,72(±0,24) | 0,48(±0,12) | -0,58 | | NS |
| NFATC2IP | 0,95(±0,17) | 3,11(±2,19) | 1,71 | | NS |
| NFATC3 | 3,55(±0,24) | 5,83(±2,95) | 0,71 | | NS |
| PYCARD | 1,56(±0,48) | 1,42(±0,28) | -0,14 | | NS |
| RIPK1 | 0,54(±0,22) | 0,67(±0,07) | 0,31 | | NS |
| RIPK2 | 1,04(±0,24) | 0,83(±0,45) | -0,32 | | NS |
| RPS27A | 87,26(±31,28) | 82,93(±16,44) | -0,07 | | NS |
| SCYE1 | 0,89(±0,13) | 1,10(±0,27) | 0,31 | NS | |
| SOCS1 | 0,87(±0,26) | 1,31(±0,57) | 0,60 | NS | |

| | | | | | |
|-----------|--------------|--------------|-------|---------------------|----|
| SOCS2 | 0,55(±0,22) | 0,35(±0,07) | -0,66 | NÃO Significante | NS |
| SOCS5 | 0,50(±0,19) | 0,48(±0,13) | -0,06 | | NS |
| SOCS6 | 0,57(±0,27) | 0,38(±0,15) | -0,58 | | NS |
| SPP1 | 0,45(±0,35) | 0,38(±0,14) | -0,22 | | NS |
| STAT1 | 9,48(±2,70) | 7,29(±0,59) | -0,38 | | NS |
| STAT6 | 36,35(±8,57) | 30,55(±9,73) | -0,25 | | NS |
| TFCP2 | 0,84(±0,13) | 0,73(±0,15) | -0,20 | | NS |
| TGFB3 | 0,51(±0,21) | 0,67(±0,46) | 0,39 | | NS |
| TH1L | 0,42(±0,26) | 0,19(±0,07) | -1,17 | | NS |
| TLR6 | 0,64(±0,14) | 0,48(±0,17) | -0,43 | | NS |
| TNFRSF10B | 8,39(±1,58) | 8,03(±1,49) | -0,06 | | NS |
| TNFRSF11B | 0,40(±0,19) | 0,83(±0,87) | 1,05 | | NS |
| TNFRSF12A | 0,49(±0,12) | 1,19(±0,66) | 1,28 | | NS |
| TNFRSF18 | 0,56(±0,21) | 0,31(±0,12) | -0,87 | | NS |
| TNFRSF21 | 0,62(±0,18) | 1,11(±0,48) | 0,83 | | NS |
| TNFRSF25 | 4,64(±1,63) | 8,87(±4,56) | 0,94 | | NS |
| TNFRSF6B | 2,54(±1,17) | 3,34(±0,83) | 0,39 | | NS |
| TNFRSF7 | 11,63(±3,97) | 5,93(±4,27) | -0,97 | | NS |
| TNFRSF9 | 0,33(±0,14) | 0,22(±0,13) | -0,57 | | NS |
| TNFSF7 | 0,65(±0,15) | 0,66(±0,32) | 0,02 | | NS |
| TP53 | 0,99(±0,33) | 3,54(±2,25) | 1,84 | | NS |
| TP53BP2 | 0,80(±0,14) | 1,59(±0,65) | 0,99 | | NS |
| TP73L | 1,16(±1,36) | 1,10(±0,55) | -0,09 | | NS |
| TRADD | 11,10(±2,34) | 13,50(±2,73) | 0,28 | | NS |
| TRAF1 | 1,23(±0,25) | 0,91(±0,27) | -0,44 | | NS |
| TRAF2 | 0,28(±0,12) | 0,26(±0,15) | -0,11 | | NS |
| TRAF3 | 0,52(±0,11) | 0,38(±0,16) | -0,44 | | NS |
| TRAF4 | 2,06(±1,06) | 1,99(±0,46) | -0,05 | | NS |
| XCR1 | 0,99(±0,23) | 0,91(±0,23) | -0,13 | | NS |

A comparação da diferença da expressão genética realizada no grupo experimental, demonstrou 83 genes com diferença estatisticamente significativa. Desse total, 40 genes estavam com expressão diminuída, e 43 com elevada expressão genética.

TABELA 7. Expressão genética da comparação de tecido gengival e sangue nos pacientes do grupo CP. A média (\pm DP) dos níveis de expressão dos genes obtidas de ambas as amostras (gengiva e sangue), assim como a razão e Log_2 da expressão tecido gengival versus sangue, estão demonstradas abaixo. Valores de log_2 abaixo de -1 foram considerados como baixa expressão e acima de +1 como elevada expressão genética. O valor de p da foi calculado pelo teste t bicaudal.

| GENE | Média (\pm DV) Sangue (S) | Média (\pm DV) Tecido gengival (TG) | Log_2 S:PB | Expressão | Valor de P |
|---------------------------|---------------------------------|---|---------------------|------------------------|------------|
| CXCR3 | 3,82(\pm 2,39) | 0,95(\pm 0,50) | -2,01 | Expressão Diminuída | 0,005 |
| BCL2 | 2,18(\pm 0,66) | 1,09(\pm 0,28) | -1,01 | | 0,0001 |
| NFATC1 | 0,95(\pm 0,34) | 0,47(\pm 0,18) | -1,02 | | 0,0010 |
| BCL2L12 | 0,57(\pm 0,15) | 0,94(\pm 0,51) | -1,02 | | 0,05 |
| TNFRSF10B | 7,09(\pm 1,32) | 10,87(\pm 3,91) | -1,05 | | 0,010 |
| TNFRSF10C | 3,74(\pm 1,02) | 1,79(\pm 0,61) | -1,06 | | 0,0001 |
| STAT4 | 2,64(\pm 1,00) | 0,61(\pm 0,23) | -2,11 | | 0,0001 |
| JAK3 | 3,56(\pm 0,93) | 1,65(\pm 0,51) | -1,11 | | 0,0001 |
| BLR1 | 4,98(\pm 3,67) | 1,14(\pm 1,02) | -2,13 | | 0,010 |
| MAF | 0,37(\pm 0,19) | 0,17(\pm 0,08) | -1,12 | | 0,010 |
| CCL7 | 1,46(\pm 0,37) | 0,66(\pm 0,25) | -1,15 | | 0,0001 |
| TLR2 | 2,54(\pm 1,03) | 0,56(\pm 0,17) | -2,19 | | 0,0001 |
| TLR4 | 11,05(\pm 5,55) | 1,17(\pm 0,51) | -3,24 | | 0,0001 |
| IL5RA | 0,41(\pm 0,13) | 0,18(\pm 0,07) | -1,23 | | 0,0001 |
| IL8RA | 10,36(\pm 3,94) | 0,55(\pm 0,40) | -2,27 | | 0,0001 |
| TNFRSF8 | 1,61(\pm 0,44) | 0,65(\pm 0,27) | -1,30 | | 0,0001 |
| MAPK8 | 5,63(\pm 2,70) | 2,26(\pm 1,41) | -1,31 | | 0,005 |
| IL10 | 0,57(\pm 0,16) | 0,89(\pm 0,38) | -1,31 | | 0,05 |
| BCL2L1 | 20,35(\pm 10,01) | 4,05(\pm 1,55) | -2,33 | | 0,0001 |

| | | | | | |
|---------------------------|----------------|-----------------------|--------------|---------------------|--------|
| DFFB | 0,49(±0,14) | 0,72(±0,25) | -1,32 | Expressão Diminuída | 0,05 |
| CCR7 | 10,80(±5,90) | 1,04(± 0,92) | -3,38 | | 0,0001 |
| CD4 | 28,69 (±6,47) | 10,88(±2,40) | -1,40 | | 0,0001 |
| PTPRC | 12,40 (±4,54) | 0,26(±0,14) | -2,43 | | 0,0001 |
| BCL2A1 | 2,72(±0,50) | 3,78(±1,11) | -2,43 | | 0,05 |
| IL17R | 1,03(±0,33) | 0,37(±0,09) | -1,48 | | 0,0001 |
| TNFRSF1B | 43,96(±18,36) | 7,84(± 3,05) | -2,49 | | 0,0001 |
| GATA3 | 1,53 (±0,58) | 0,48(±0,33) | -2,54 | | 0,0001 |
| IL12B | 0,70(±0,57) | 0,12(± 0,08) | -2,59 | | 0,005 |
| PF4 | 15,36 (±6,26) | 1,17(±0,94) | -3,72 | | 0,0001 |
| IL18BP | 0,69(±0,28,) | 0,21(± 0,10) | -1,71 | | 0,0001 |
| IL8RB | 17,68(±9,99) | 5,30(± 2,61) | -1,74 | | 0,005 |
| CCR1 | 10,91(±9,61) | 1,62(± 1,18) | -2,75 | | 0,010 |
| CD86 | 1,87 (±0,50) | 2,31(±1,68) | -1,78 | | 0,0001 |
| CD40LG | 3,44 (±1,29) | 2,14(±0,73) | -2,83 | | 0,0001 |
| CCL5 | 49,02(±38,44) | 6,90(± 3,79) | -2,83 | | 0,005 |
| CX3CR1 | 7,17 (±2,86) | 0,49(±0,15) | -3,86 | | 0,0001 |
| IL12RB1 | 0,50(±0,21) | 0,14(± 0,07) | -1,87 | | 0,0001 |
| IL9 | 1,76(±1,35) | 0,48(± 0,18) | -1,87 | | 0,010 |
| IL2RG | 16,10 (±4,65) | 2,18(±1,53) | -2,89 | | 0,0001 |
| TNFRSF10A | 1,15(± 0,20) | 1,68(±0,56) | -2,98 | 0,05 | |
| BOK | 1,54(±0,39) | 3,20(± 1,06) | 1,05 | Expressão-aumentada | 0,0005 |
| JUNB | 120,77(±61,41) | 65,39(±22,37) | 4,02 | | 0,05 |
| NFATC4 | 0,63(±0,13) | 5,42 (± 1,21) | 3,10 | | 0,0001 |
| IGF1R | 2,36(±1,10) | 5,33(± 2,08) | 1,17 | | 0,0010 |
| FOSL1 | 0,75(±0,69) | 3,36(± 2,31) | 2,16 | | 0,005 |
| NFATC2IP | 0,86(±0,21) | 3,88(± 2,06) | 2,18 | | 0,0005 |
| CASP9 | 1,15(±0,39) | 2,79(± 1,03) | 1,28 | | 0,0005 |
| IL4R | 5,11(±1,52) | 12,44(± 4,91) | 1,28 | | 0,0005 |
| LTBR | 1,29(±0,29) | 6,26(±2,52) | 2,28 | | 0,0001 |
| IL6R | 0,77(±0,27) | 3,76 (± 1,51) | 2,28 | | 0,0001 |
| IL1R1 | 0,72 (±0,21) | 3,53(±1,17) | 2,29 | | 0,0001 |
| BCL2L13 | 1,07(±0,27) | 2,68(± 1,10) | 1,32 | | 0,0005 |
| GAPDH | 11,28(±5,08) | 28,65(± 13,71) | 1,35 | | 0,005 |
| DTX2 | 1,83(±0,61) | 9,37(± 4,26) | 2,35 | | 0,0001 |

| | | | | | |
|--------------------------|--------------|----------------------|--------------|---------------------|--------|
| TNFRSF1A | 3,44(±1,00) | 8,91(± 3,91) | 1,37 | Expressão-aumentada | 0,0005 |
| SFTPD | 0,73(±0,35) | 2,10(± 0,99) | 1,53 | | 0,0010 |
| CCL2 | 0,59(±0,14) | 6,85(± 4,05) | 3,54 | | 0,0001 |
| YY1 | 2,45(±0,70) | 7,21(± 4,70) | 1,56 | | 0,010 |
| BCLAF1 | 1,05(±0,30) | 3,11(± 1,17) | 1,57 | | 0,0001 |
| BIRC2 | 2,14 (±0,47) | 6,56(±1,11) | 1,62 | | 0,0001 |
| CARD10 | 0,30(±0,10) | 1,86(± 1,02) | 2,62 | | 0,0001 |
| SFTPD | 0,73(±0,35) | 2,10(± 0,99) | 1,53 | | 0,0010 |
| CCL2 | 0,59(±0,14) | 6,85(± 4,05) | 3,54 | | 0,0001 |
| YY1 | 2,45(±0,70) | 7,21(± 4,70) | 1,56 | | 0,010 |
| BCLAF1 | 1,05(±0,30) | 3,11(± 1,17) | 1,57 | | 0,0001 |
| BIRC2 | 2,14 (±0,47) | 6,56(±1,11) | 1,62 | | 0,0001 |
| CARD10 | 0,30(±0,10) | 1,86(± 1,02) | 2,62 | | 0,0001 |
| GADD45A | 0,70(±0,17) | 2,19(±0,95) | 1,64 | | 0,0001 |
| CXCL2 | 0,50(±0,46) | 3,10(± 2,32) | 2,65 | | 0,005 |
| BIRC5 | 0,52(±0,22) | 3,33(± 1,59) | 2,67 | | 0,0001 |
| IL1A | 0,33 (±0,13) | 8,65(± 7,00) | 4,70 | | 0,005 |
| CXCL1 | 0,57(±0,45) | 15,73(±15,41) | 4,80 | | 0,010 |
| IL8 | 0,74(±0,33) | 5,27(±4,71) | 2,84 | | 0,010 |
| BCL3 | 6,18(±1,77) | 22,66(±8,05) | 1,88 | | 0,0001 |
| BAG3 | 0,76 (±0,37) | 5,64(±1,62) | 2,90 | | 0,0001 |
| IL1RN | 1,84 (±0,69) | 54,13(±19,11) | 4,88 | | 0,0001 |
| CASP7 | 0,47 (±0,25) | 1,80(±0,54) | 1,95 | | 0,0001 |
| JAK2 | 3,29(±0,58) | 12,96(± 7,79) | 1,98 | | 0,0010 |
| BCL3 | 6,18(±1,77) | 22,66(±8,05) | 1,88 | | 0,0001 |
| BAG3 | 0,76 (±0,37) | 5,64(±1,62) | 2,90 | | 0,0001 |
| IL1RN | 1,84 (±0,69) | 54,13(±19,11) | 4,88 | 0,0001 | |
| CASP7 | 0,47 (±0,25) | 1,80(±0,54) | 1,95 | 0,0001 | |
| GLMN | 0,50(±0,29) | 0,31(±0,08) | 1,47 | NS | |
| IL17C | 1,28(±0,25) | 0,89(±0,54) | 0,40 | Não Significante | NS |
| AKT1 | 9,64(±3,49) | 9,79(±3,00) | 0,02 | | NS |
| APAF1 | 2,63(±0,42) | 2,68(± 0,65) | 0,03 | | NS |
| BAK1 | 6,02(± 4,92) | 7,61(± 1,87) | -0,20 | | NS |
| BAX | 2,80(±0,66) | 2,79(± 0,84) | -0,01 | | NS |
| BCL2L2 | 0,51(±0,18) | 0,56(± 0,17) | 0,14 | | NS |

| | | | | | |
|-------------------------|---------------|---------------------|--------------|---------------------|----|
| BCL6 | 3,82(±0,97) | 3,74(± 1,35) | -0,03 | Não Significante | NS |
| BFAR | 0,36(±0,21) | 0,32(±0,09) | -0,16 | | NS |
| BID | 1,83(±0,36) | 1,85(±0,40) | 0,02 | | NS |
| BIK | 0,32(± 0,12) | 0,25(±0,08) | -0,38 | | NS |
| BIRC4 | 0,49(±0,17) | 0,61(±0,51) | 0,32 | | NS |
| BNIP3L | 2,38(± 1,35) | 1,73(± 0,67) | 0,28 | | NS |
| CASP2 | 5,57(±1,94) | 6,76(± 2,24) | 0,22 | | NS |
| CCL3 | 1,08(±0,85) | 1,23(± 1,13) | 0,19 | | NS |
| CCL8 | 0,51(±0,13) | 0,57(± 0,21) | 0,65 | | NS |
| CEBPB | 3,66(± 0,90) | 3,23(±1,04) | 0,34 | | NS |
| CIDEB | 3,31(±0,78) | 3,88(± 1,76) | 0,55 | | NS |
| CREBBP | 2,32(±0,77) | 2,48(± 1,27) | 0,10 | | NS |
| CXCL3 | 0,72(± 0,66) | 0,33(±0,19) | -0,46 | | NS |
| DAPK1 | 2,01(± 0,38) | 2,27(± 0,55) | 0,21 | | NS |
| DAPK2 | 0,97(± 0,24) | 1,12(±0,19) | 0,78 | | NS |
| EDG3 | 0,81(±0,46) | 0,51(±0,24) | 0,34 | | NS |
| FADD | 1,19(±0,44) | 1,15(± 0,49) | -0,05 | | NS |
| FOSL2 | 4,11(±0,88) | 4,55(± 2,06) | 0,15 | | NS |
| GFI1 | 5,05(±1,58) | 5,02(±2,54) | -0,01 | | NS |
| IL10RA | 8,86(±4,07) | 4,84(±4,98) | -0,67 | | NS |
| IL10RB | 3,15(±1,00) | 3,98(± 1,01) | 0,99 | | NS |
| IL11RA | 1,98(±0,79) | 2,00(±1,50) | 0,01 | | NS |
| IL12A | 1,34(±0,71) | 1,22(±0,45) | -0,14 | | NS |
| IL12RB2 | 0,46(±0,22) | 0,45(±0,15) | -0,03 | | NS |
| IL17F | 0,77(±0,23) | 0,89(±0,21) | 0,31 | | NS |
| IL18 | 0,48(±0,27) | 1,33(±1,32) | -0,87 | | NS |
| IL1R2 | 5,48(±2,39) | 5,58(± 2,96) | 0,03 | | NS |
| IL2RB | 0,95(±0,39) | 0,61(±1,23) | 0,17 | | NS |
| IL5 | 0,65(±0,15) | 0,67(± 0,18) | 0,03 | | NS |
| IRF1 | 7,01(±1,43) | 6,88(±1,74) | -0,03 | | NS |
| JAK1 | 2,36(±0,89) | 2,48(± 1,19) | 0,07 | NS | |
| JUN | 1,67(± 1,13) | 3,30(±2,57) | -1,13 | NS | |
| JUND | 23,25(± 9,95) | 18,65(±8,31) | -0,18 | NS | |
| MAP2K7 | 5,03(±1,04) | 5,85(± 1,85) | 0,17 | NS | |
| MAPK10 | 0,59(±0,24) | 0,62(± 0,19) | 0,08 | NS | |

| | | | | | |
|--------------------------|---------------|----------------------|--------------|---------------------|----|
| NFATC3 | 4,08(± 1,32) | 5,59(±2,49) | -0,39 | Não Significante | NS |
| PYCARD | 1,48(± 0,41) | 1,96(±1,02) | 0,63 | | NS |
| RIPK1 | 0,67(±0,27) | 0,74(±0,20) | 0,13 | | NS |
| RIPK2 | 0,78(± 0,21) | 1,21(±0,96) | -0,46 | | NS |
| RPS27A | 81,30(±30,34) | 86,90(±18,56) | 0,10 | | NS |
| RPS27A | 91,08(±55,18) | 89,60(±17,71) | -0,02 | | NS |
| SCYE1 | 0,83(±0,18) | 0,75(±0,18) | -0,64 | | NS |
| SOCS1 | 1,03(±0,28) | 1,35(±0,42) | -0,36 | | NS |
| SOCS4 | 0,57(±0,26) | 0,71(±0,28) | -0,32 | | NS |
| STAT1 | 7,38(±1,99) | 10,91(±6,62) | 0,21 | | NS |
| STAT6 | 26,95(±8,49) | 23,48(± 7,94) | 0,19 | | NS |
| TFCP2 | 0,93(±0,19) | 0,72(±0,25) | -0,71 | | NS |
| TMED1 | 2,58(±0,54) | 1,99(±1,01) | 0,56 | | NS |
| TNFRSF25 | 6,47(±3,19) | 7,18(±2,80) | 0,15 | | NS |
| TNFRSF6B | 3,42(± 0,96) | 3,90(±1,31) | 0,23 | | NS |
| TNFRSF7 | 17,23(±9,03) | 25,24(±26,37) | -0,13 | | NS |
| TP73L | 0,40(±0,11) | 0,69(±0,62) | 0,41 | | NS |
| TRAF1 | 1,22(± 0,48) | 0,89(±0,35) | 0,45 | | NS |
| TRAF3 | 0,47(±0,19) | 0,51(± 0,15) | 0,14 | | NS |
| TRAF4 | 1,87(±1,15) | 1,82(±0,51) | -0,04 | | NS |

A comparação das amostras de sangue obtidas dos pacientes do grupo experimental versus experimental (PC) *versus* controle (NP), revelou que 7 genes com diferenças estatisticamente significantes. Porém, a expressão genética era menor que 2 vezes, e seguindo nosso critério (já especificado anteriormente), não foram considerados biologicamente significantes.

TABELA 8. Resultado da análise da comparação da diferença da expressão genética das amostras de sangue (CP) *versus* NP). A média (±DP) dos níveis de expressão dos genes obtidas de ambas as amostras (gengiva e sangue) , assim como a razão e Log_2 da expressão tecido gengival versus sangue, estão demonstradas abaixo. Valores de log_2 abaixo de -1 foram considerado como baixa

expressão e acima de +1 como elevada expressão genética. O valor de p da foi calculado pelo teste t bicaudal.

| GENE | MÉDIA (± DV) GRUPO PC | MÉDIA (± SD) GRUPO NP | Log ₂ PC:NP | Expressão | Valor de P |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------|
| <u>BIRC2</u> | 2,14(±0,47) | 2,89(+0,15) | -0,44 | Estatisticamente Significativo | 0,01 |
| <u>BID</u> | 1,83(±0,36) | 2,54(+0,49) | -0,47 | | 0,05 |
| <u>CASP4</u> | 4,78(±0,93) | 6,61(+1,50) | -0,47 | | 0,05 |
| <u>CASP1</u> | 1,19(±0,27) | 1,71(+0,21) | -0,52 | | 0,005 |
| <u>BCLAF1</u> | 1,05(±0,30) | 1,60(+0,65) | -0,61 | | 0,05 |
| <u>TNFSF10</u> | 2,44(±0,85) | 3,87(+1,41) | -0,67 | | 0,05 |
| <u>CARD6</u> | 0,82(±0,19) | 1,40(+0,55) | -0,77 | | 0,01 |
| <u>BCL2L1</u> | 20,35(±10,01) | 9,52(+4,35) | 1,10 | Não Significante | NS |
| <u>CASP3</u> | 1,46(±1,43) | 0,68(+0,27) | 1,10 | | NS |
| <u>CCR1</u> | 10,91(±9,61) | 5,04(+1,56) | 1,11 | | NS |
| <u>GATA3</u> | 1,53(±0,58) | 1,51(+0,69) | 0,01 | | NS |
| <u>DAPK1</u> | 2,01(±0,38) | 2,05(+0,54) | -0,02 | | NS |
| <u>DTX2</u> | 1,83(±0,61) | 1,81(+0,69) | 0,02 | | NS |
| <u>TNFRSF1B</u> | 43,96(±18,36) | 44,43(+9,43) | -0,02 | | NS |
| <u>TRAF1</u> | 1,22(±0,48) | 1,23(+0,25) | -0,02 | | NS |
| <u>BCL2L12</u> | 0,57(±0,15) | 0,56(+0,28) | 0,03 | | NS |
| <u>BNIP3</u> | 2,14(±0,74) | 2,09(+0,46) | 0,03 | | NS |
| <u>CCL7</u> | 1,46(±0,37) | 1,43(+0,49) | 0,03 | | NS |
| <u>IL8RA</u> | 10,36(±3,94) | 10,18(+3,19) | 0,03 | | NS |
| <u>JAG1</u> | 0,55(±0,23) | 0,54(+0,20) | 0,03 | | NS |
| <u>SOCS4</u> | 0,57(±0,26) | 0,56(+0,14) | 0,03 | | NS |
| <u>CXCR4</u> | 6,53(±2,91) | 6,74(+0,98) | -0,04 | | NS |
| <u>MCL1</u> | 16,02(±3,87) | 16,49(+3,09) | -0,04 | | NS |
| <u>BCL2L13</u> | 1,07(±0,27) | 1,11(+0,28) | -0,05 | | NS |
| <u>BIRC3</u> | 0,63(±0,20) | 0,66(+0,28) | -0,05 | | NS |
| <u>FOS</u> | 1,79(±0,82) | 1,86(+0,49) | -0,05 | | NS |
| <u>CD40LG</u> | 3,44(±1,29) | 3,31(+0,93) | 0,06 | | NS |
| <u>CX3CL1</u> | 0,29(±0,18) | 0,27(+0,12) | 0,06 | | NS |
| <u>NFKB1</u> | 6,00(±1,50) | 5,76(+0,86) | 0,06 | | NS |
| <u>FADD</u> | 1,19(±0,44) | 1,25(+0,17) | -0,07 | | NS |
| <u>JAK2</u> | 3,29(±0,58) | 3,45(+0,19) | -0,07 | NS | |

| | | | | | |
|------------------|----------------|----------------|-------|--------------------|----|
| AKT1 | 9,64(±3,49) | 10,21(+7,12) | -0,08 | Nã Significante | NS |
| CREBBP | 2,32(±0,77) | 2,19(+1,21) | 0,08 | | NS |
| DAPK2 | 0,97(±0,24) | 0,92(+0,08) | 0,08 | | NS |
| IL2RG | 16,10(±4,65) | 15,21(+4,86) | 0,08 | | NS |
| NFATC4 | 0,63(±0,13) | 0,67(+0,20) | -0,08 | | NS |
| PCGF2 | 0,93(±0,29) | 0,88(+0,25) | 0,08 | | NS |
| PYCARD | 1,48(±0,41) | 1,56(+0,48) | -0,08 | | NS |
| TNF | 1,10(±0,23) | 1,16(±0,31) | -0,08 | | NS |
| TP53BP2 | 0,76(±0,25) | 0,80(+0,14) | -0,08 | | NS |
| CARD9 | 0,96(±0,32) | 1,03(±0,17) | -0,09 | | NS |
| TMED1 | 2,58(±0,54) | 2,43(±0,22) | 0,09 | | NS |
| NS_BCL2 | 2,18(±0,66) | 2,03(+0,67) | 0,10 | | NS |
| GFI1 | 5,05(±1,58) | 5,42(±2,62) | -0,10 | | NS |
| IL10 | 0,57(±0,16) | 0,53(±0,12) | 0,10 | | NS |
| RPS27A | 81,30(±30,34) | 87,26(+31,28) | -0,10 | | NS |
| SCYE1 | 0,83(±0,18) | 0,89(+0,13) | -0,10 | | NS |
| GADD45A | 0,70(±0,17) | 0,65(+0,08) | 0,11 | | NS |
| BCL2L2 | 0,51(±0,18) | 0,55(+0,20) | -0,12 | | NS |
| BIRC5 | 0,52(±0,22) | 0,57(+0,12) | -0,12 | | NS |
| CXCL1 | 0,57(±0,45) | 0,52(+0,23) | 0,13 | | NS |
| IGF1R | 2,36(±1,10) | 2,58(+0,61) | -0,13 | | NS |
| TNFRSF12A | 0,53(±0,18) | 0,49(+0,12) | 0,13 | | NS |
| ABL1 | 2,81(±1,11) | 2,56(+1,01) | 0,14 | | NS |
| BAG1 | 5,61(±1,80) | 6,17(+2,77) | -0,14 | | NS |
| NFATC2IP | 0,86(±0,21) | 0,95(+0,17) | -0,14 | | NS |
| TFCP2 | 0,93(±0,19) | 0,84(+0,13) | 0,14 | | NS |
| TRAF3 | 0,47(±0,19) | 0,52(+0,11) | -0,14 | | NS |
| TRAF4 | 1,87(±1,15) | 2,06(+1,06) | -0,14 | | NS |
| SFTPD | 0,73(±0,35) | 0,66(+0,10) | 0,15 | | NS |
| IL9 | 1,76(±1,35) | 1,57(±0,97) | 0,16 | | NS |
| JUNB | 120,77(±61,41) | 107,99(±28,48) | 0,16 | | NS |
| NOL3 | 0,41(±0,20) | 0,45(+0,15) | -0,16 | | NS |
| BAG3 | 0,76(±0,37) | 0,67(+0,17) | 0,17 | NS | |
| BOK | 1,54(±0,39) | 1,37(±0,57) | 0,17 | NS | |
| CASP2 | 5,57(±1,94) | 4,94(+1,22) | 0,17 | NS | |

| | | | | | |
|------------------|--------------|--------------|-------|---------------------|----|
| CRADD | 1,29(±0,21) | 1,45(+0,09) | -0,17 | Não Significante | NS |
| IL10RA | 8,86(±4,07) | 7,90(+2,20) | 0,17 | | NS |
| IL5 | 0,65(±0,15) | 0,73(+0,10) | -0,17 | | NS |
| TRADD | 9,84(±3,19) | 11,10(+2,34) | -0,17 | | NS |
| IL1B | 7,59(±2,07) | 8,60(+2,88) | -0,18 | | NS |
| IL4R | 5,11(±1,52) | 5,80(+2,12) | -0,18 | | NS |
| TNFRSF1A | 3,44(±1,00) | 3,91(+0,84) | -0,18 | | NS |
| YY1 | 2,45(±0,70) | 2,78(+0,42) | -0,18 | | NS |
| LTA | 3,31(±1,26) | 2,91(+0,41) | 0,19 | | NS |
| PF4 | 15,36(±6,26) | 13,46(+3,38) | 0,19 | | NS |
| BAX | 2,80(±0,66) | 2,44(+0,94) | 0,20 | | NS |
| BFAR | 0,36(±0,21) | 0,41(+0,18) | -0,20 | | NS |
| IL5RA | 0,41(±0,13) | 0,47(+0,17) | -0,20 | | NS |
| NFATC3 | 4,08(±1,32) | 3,55(+0,24) | 0,20 | | NS |
| CEBPB | 3,66(±0,90) | 4,22(+1,93) | -0,21 | | NS |
| IL1RN | 1,84(±0,69) | 2,13(+0,53) | -0,21 | | NS |
| TNFRSF10A | 1,15(±0,20) | 0,99(+0,40) | 0,21 | | NS |
| CD4 | 28,69(±6,47) | 24,64(+6,50) | 0,22 | | NS |
| BCL3 | 6,18(±1,77) | 7,26(+1,52) | -0,23 | | NS |
| IL1R1 | 0,72(±0,21) | 0,84(+0,26) | -0,23 | | NS |
| TNFRSF10B | 7,09(±1,32) | 8,39(+1,58) | -0,24 | | NS |
| TNFRSF8 | 1,61(±0,44) | 1,91(+0,24) | -0,24 | | NS |
| BIRC4 | 0,49(±0,17) | 0,58(+0,14) | -0,25 | | NS |
| CCL2 | 0,59(±0,14) | 0,50(+0,17) | 0,25 | | NS |
| MAPK9 | 1,76(±0,30) | 2,08(+0,36) | -0,25 | | NS |
| SOCS1 | 1,03(±0,28) | 0,87(+0,26) | 0,25 | | NS |
| MAPK10 | 0,59(±0,24) | 0,49(+0,18) | 0,28 | | NS |
| TNFRSF9 | 0,40(±0,16) | 0,33(+0,14) | 0,28 | | NS |
| BIK | 0,32(±0,12) | 0,39(+0,19) | -0,29 | | NS |
| CD86 | 1,87(±0,50) | 2,30(+0,41) | -0,29 | | NS |
| CX3CR1 | 7,17(±2,86) | 8,85(+0,70) | -0,30 | | NS |
| NFATC2 | 0,88(±0,40) | 0,72(+0,24) | 0,30 | NS | |
| TLR6 | 0,79(±0,30) | 0,64(+0,14) | 0,30 | NS | |
| IL2RA | 0,65(±0,22) | 0,53(+0,24) | 0,31 | NS | |
| IL6 | 0,26(±0,16) | 0,32(+0,19) | -0,31 | NS | |

| | | | | | |
|------------------|---------------|--------------|-------|---------------------|----|
| <u>CIDEB</u> | 3,31(±0,78) | 4,14(+0,45) | -0,32 | Não Significante | NS |
| <u>RIPK1</u> | 0,67(±0,27) | 0,54(+0,22) | 0,32 | | NS |
| <u>CASP7</u> | 0,47(±0,25) | 0,59(+0,30) | -0,33 | | NS |
| <u>IL13RA1</u> | 1,48(±0,55) | 1,87(+0,83) | -0,33 | | NS |
| <u>IL6R</u> | 0,77(±0,27) | 0,97(+0,56) | -0,33 | | NS |
| <u>ITGAE</u> | 1,05(±0,15) | 1,32(+0,24) | -0,33 | | NS |
| <u>MAP2K7</u> | 5,03(±1,04) | 3,99(+0,33) | 0,33 | | NS |
| <u>TP53</u> | 1,24(±0,36) | 0,99(±0,33) | 0,33 | | NS |
| <u>FOSL2</u> | 4,11(±0,88) | 3,26(+1,01) | 0,34 | | NS |
| <u>TNFRSF10C</u> | 3,74(±1,02) | 2,96(±1,08) | 0,34 | | NS |
| <u>DFFB</u> | 0,49(±0,14) | 0,63(±0,15) | -0,35 | | NS |
| <u>IL17C</u> | 1,28(±0,25) | 1,01(+0,41) | 0,35 | | NS |
| <u>JUN</u> | 1,67(±1,13) | 1,31(±0,15) | 0,35 | | NS |
| <u>TLR2</u> | 2,54(±1,03) | 3,24(+1,27) | -0,35 | | NS |
| <u>CASP9</u> | 1,15(±0,39) | 1,48(+0,35) | -0,36 | | NS |
| <u>JAK1</u> | 2,36(±0,89) | 3,03(+0,79) | -0,36 | | NS |
| <u>STAT1</u> | 7,38(±1,99) | 9,48(+2,70) | -0,36 | | NS |
| <u>TLR4</u> | 11,05(±5,55) | 8,64(+4,67) | 0,36 | | NS |
| <u>IL11RA</u> | 1,98(±0,79) | 1,53(+0,56) | 0,37 | | NS |
| <u>CXCL5</u> | 2,80(±0,75) | 2,15(±0,22) | 0,38 | | NS |
| <u>EDG3</u> | 0,81(±0,46) | 1,06(+0,63) | -0,38 | | NS |
| <u>GAPDH</u> | 11,28(±5,08) | 8,67(+2,31) | 0,38 | | NS |
| <u>IL3</u> | 0,64(±0,15) | 0,50(+0,30) | 0,38 | | NS |
| <u>IL8</u> | 0,74(±0,33) | 0,57(+0,23) | 0,38 | | NS |
| <u>JAK3</u> | 3,56(±0,93) | 2,74(+0,64) | 0,38 | | NS |
| <u>CCL8</u> | 0,51(±0,13) | 0,39(+0,16) | 0,39 | | NS |
| <u>LAG3</u> | 1,71(±0,83) | 1,30(+0,32) | 0,39 | | NS |
| <u>APAF1</u> | 2,63(±0,42) | 3,48(+2,41) | -0,41 | | NS |
| <u>CCR5</u> | 4,00(±2,86) | 5,30(+1,57) | -0,41 | | NS |
| <u>IL10RB</u> | 3,15(±1,00) | 4,17(±1,03) | -0,41 | | NS |
| <u>CCL5</u> | 49,02(±38,44) | 36,64(±9,77) | 0,42 | | NS |
| <u>IL18</u> | 0,48(±0,27) | 0,36(+0,07) | 0,42 | NS | |
| <u>RIPK2</u> | 0,78(±0,21) | 1,04(+0,24) | -0,42 | NS | |
| <u>CXCR3</u> | 3,82(±2,39) | 2,84(±0,59) | 0,43 | NS | |
| <u>IL17F</u> | 0,77(±0,23) | 0,57(+0,21) | 0,43 | NS | |

| | | | | | |
|-----------------|--------------|--------------|-------|---------------------|----|
| STAT6 | 26,95(±8,49) | 36,35(+8,57) | -0,43 | Não Significante | NS |
| TNFRSF6B | 3,42(±0,96) | 2,54(+1,17) | 0,43 | | NS |
| BNIP2 | 0,34(±0,14) | 0,46(+0,05) | -0,45 | | NS |
| LTBR | 1,29(±0,29) | 1,77(+0,65) | -0,45 | | NS |
| TNFRSF25 | 6,47(±3,19) | 4,64(+1,63) | 0,48 | | NS |
| BCL2A1 | 2,72(±0,50) | 3,84(+0,72) | -0,50 | | NS |
| CXCL2 | 0,50(±0,46) | 0,35(+0,06) | 0,50 | | NS |
| PTPRC | 12,40(±4,54) | 17,48(+3,45) | -0,50 | | NS |
| STAT4 | 2,64(±1,00) | 3,73(+1,36) | -0,50 | | NS |
| IL12A | 1,34(±0,71) | 0,94(±0,19) | 0,51 | | NS |
| CARD10 | 0,30(±0,10) | 0,21(±0,18) | 0,52 | | NS |
| IL12RB2 | 0,46(±0,22) | 0,32(+0,12) | 0,52 | | NS |
| IL1A | 0,33(±0,13) | 0,23(±0,16) | 0,52 | | NS |
| TP73L | 0,40(±0,11) | 1,16(+1,36) | -1,53 | | NS |
| IL8RB | 17,68(±9,99) | 25,50(+9,07) | -0,53 | | NS |
| BCL6 | 3,82(±0,97) | 5,54(+2,49) | -0,54 | | NS |
| BLR1 | 4,98(±3,67) | 3,43(+1,42) | 0,54 | | NS |
| BNIP3L | 2,38(±1,35) | 1,65(+0,60) | 0,54 | | NS |
| IL1R2 | 5,48(±2,39) | 7,96(+4,91) | -0,54 | | NS |
| BAK1 | 6,02(±4,92) | 4,11(+1,11) | 0,55 | | NS |
| DFFA | 1,27(±0,42) | 0,87(+0,41) | 0,55 | | NS |
| TNFRSF7 | 17,23(±9,03) | 11,63(+3,97) | 0,57 | | NS |
| MAPK8 | 5,63(±2,70) | 3,74(+1,46) | 0,59 | | NS |
| IL11 | 0,46(±0,21) | 0,31(+0,17) | 0,60 | | NS |
| JUND | 23,25(±9,95) | 15,33(+7,34) | 0,60 | | NS |
| FOSL1 | 0,75(±0,69) | 0,46(+0,09) | 0,71 | | NS |
| IL18BP | 0,69(±0,28) | 0,42(+0,10) | 0,73 | | NS |
| CCL3 | 1,08(±0,85) | 0,63(+0,17) | 0,79 | | NS |
| IRF1 | 7,01(±1,43) | 12,29(+6,12) | -0,81 | | NS |
| CCR7 | 10,80(±5,90) | 5,71(±1,02) | 0,92 | | NS |

Padrões biológicos da expressão genética foram tipicamente identificados, pela comparação gene a gene dos níveis de expressão entre os diferentes estados (PC x NP).

A comparação das amostras de tecido gengival provenientes dos pacientes do grupo experimental versus experimental (PC) *versus* controle (NP), identificou 12 genes com diferenças estatisticamente significantes. Entre eles, verificou-se que somente o gene TNFSF10 demonstrou relevância biológica, com baixa expressão.

TABELA 9. Resultado da análise da comparação da diferença da expressão genética do tecido gengival do grupo experimental (CP) versus controle (NP). A média (\pm DP) dos níveis de expressão dos genes obtidas de ambas as amostras (gengiva e sangue), assim como a razão e \log_2 da expressão tecido gengival versus sangue, estão demonstradas abaixo. Valores de \log_2 abaixo de -1 foram considerado como baixa expressão e acima de +1 como elevada expressão genética. O valor de p da foi calculado pelo teste t bicaudal.

| GENE | MÉDIA (\pm DP) PC | MÉDIA (\pm DP) NP | Log ₂ PC:NP | Expressão | Valor de P |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|------------|
| TNFSF10 | 6,45(+3,16) | 13,29(+4,10) | -1,04 | Estatisticamente Significante | 0,01 |
| BNIP3L | 1,73(+0,67) | 3,05(+1,78) | -0,82 | | 0,01 |
| CX3CR1 | 0,49(+0,15) | 0,87(+0,14) | -0,82 | | 0,05 |
| TP53 | 2,05(+0,93) | 3,54(+2,25) | -0,79 | | 0,01 |
| IL1R1 | 3,53(+1,17) | 5,92(+1,33) | -0,75 | | 0,01 |
| SOCS4 | 0,71(+0,28) | 1,17(+0,25) | -0,73 | | 0,05 |
| BCLAF1 | 3,11(+1,17) | 5,12(+0,94) | -0,72 | | 0,05 |
| CEBPB | 3,23(+1,04) | 4,89(+1,20) | -0,60 | | 0,05 |
| SCYE1 | 0,75(+0,18) | 1,10(+0,27) | -0,54 | | 0,05 |
| BAG3 | 5,6(+41,62) | 8,08(+2,55) | -0,52 | | 0,05 |
| BNIP2 | 0,65(+0,22) | 0,92(+0,14) | -0,51 | | 0,05 |
| BFAR | 0,32(+0,09) | 0,44(+0,06) | -0,45 | | 0,05 |

| | | | | | |
|----------------|--------------|--------------|-------|-------------------------------|------|
| <u>MCL1</u> | 22,06(+6,12) | 12,80(+2,46) | 0,79 | Estatisticamente Significante | 0,05 |
| <u>CCL8</u> | 0,57(+0,21) | 0,32(+0,10) | 0,83 | | 0,05 |
| <u>ABL1</u> | 4,41 (+1,34) | 5,09(+1,44) | -0,20 | Não Significante | NS |
| <u>AKT1</u> | 9,79 (+3,00) | 13,89(+4,91) | -0,50 | | NS |
| <u>APAF1</u> | 2,68 (+0,65) | 3,25(+0,88) | -0,28 | | NS |
| <u>BAG1</u> | 3,15(+1,25) | 3,91(+1,08) | -0,31 | | NS |
| <u>BAK1</u> | 7,61(+1,87) | 7,81(+1,20) | -0,04 | | NS |
| <u>BAX</u> | 2,79(+0,84) | 2,63(+0,63) | 0,09 | | NS |
| <u>BCL2</u> | 1,09(+0,28) | 1,17(+0,33) | -0,11 | | NS |
| <u>BCL2A1</u> | 3,78(+1,11) | 4,32(+1,73) | -0,19 | | NS |
| <u>BCL2L1</u> | 4,05(+1,55) | 3,95(+1,56) | 0,04 | | NS |
| <u>BCL2L12</u> | 0,94(+0,51) | 0,68(+0,17) | 0,47 | | NS |
| <u>BCL2L13</u> | 2,68(+1,10) | 2,79(+1,25) | -0,06 | | NS |
| <u>BCL2L2</u> | 0,56(+0,17) | 0,47(+0,15) | 0,25 | | NS |
| <u>BCL3</u> | 22,66(+8,05) | 21,64(+4,34) | 0,07 | | NS |
| <u>BCL6</u> | 3,74(+1,35) | 5,60(+3,16) | -0,58 | | NS |
| <u>BID</u> | 1,85(+0,40) | 2,01(+0,41) | -0,12 | | NS |
| <u>BIK</u> | 0,25(+0,08) | 0,33(+0,08) | -0,40 | | NS |
| <u>BIRC2</u> | 6,56(+1,11) | 6,39(+1,29) | 0,04 | | NS |
| <u>BIRC3</u> | 0,89(+0,22) | 0,83(+0,20) | 0,09 | | NS |
| <u>BIRC4</u> | 0,61(+0,51) | 0,39(+0,15) | 0,63 | | NS |
| <u>BIRC5</u> | 3,33(+1,59) | 2,80(+0,46) | 0,25 | | NS |
| <u>BLR1</u> | 1,14(+1,02) | 0,93(+0,99) | 0,29 | | NS |
| <u>BNIP3</u> | 11,01(+8,58) | 10,40(+7,39) | 0,08 | | NS |
| <u>BOK</u> | 3,20(+1,06) | 3,64(+0,48) | -0,19 | | NS |
| <u>CARD10</u> | 1,86(+1,02) | 1,86(+0,77) | 0,00 | | NS |
| <u>CARD6</u> | 3,25(+1,46) | 2,86(+1,26) | 0,18 | | NS |
| <u>CARD9</u> | 0,67(+0,17) | 0,81(+0,24) | -0,26 | | NS |
| <u>CASP1</u> | 0,82(+0,21) | 0,94(+0,17) | -0,20 | NS | |
| <u>CASP2</u> | 6,76(+2,24) | 6,32(+2,74) | 0,10 | NS | |
| <u>CASP3</u> | 0,19(+0,14) | 0,31(+0,31) | -0,73 | NS | |
| <u>CASP4</u> | 8,77(+2,01) | 8,28(+2,16) | 0,08 | NS | |
| <u>CASP7</u> | 1,80(+0,54) | 2,15(+0,58) | -0,26 | NS | |
| <u>CASP9</u> | 2,79(+1,03) | 3,04(+0,84) | -0,12 | NS | |

| | | | | | |
|----------------|---------------|---------------|-------|---------------------|----|
| <u>CCL2</u> | 6,85(+4,05) | 5,31(+2,69) | 0,37 | Não Significante | NS |
| <u>CCL3</u> | 1,23(+1,13) | 1,03(+0,70) | 0,26 | | NS |
| <u>CCL5</u> | 6,90(+3,79) | 4,49(+1,13) | 0,62 | | NS |
| <u>CCL7</u> | 0,66(+0,25) | 0,63(+0,28) | 0,07 | | NS |
| <u>CCR1</u> | 1,62(+1,18) | 0,96(+0,47) | 0,76 | | NS |
| <u>CCR5</u> | 1,60(+0,86) | 1,67(+1,11) | -0,05 | | NS |
| <u>CCR7</u> | 1,04(+0,92) | 0,82(+0,36) | 0,34 | | NS |
| <u>CD4</u> | 10,88(+2,40) | 10,37 (+2,70) | 0,07 | | NS |
| <u>CD40LG</u> | 0,48(+0,33) | 0,25(+0,04) | 0,94 | | NS |
| <u>CD86</u> | 0,55(+0,40) | 0,46(+0,16) | 0,24 | | NS |
| <u>CIDEB</u> | 3,88(+1,76) | 4,59(+1,19) | -0,24 | | NS |
| <u>CRADD</u> | 3,41(+0,72) | 3,28(+0,75) | 0,06 | | NS |
| <u>CREBBP</u> | 2,48(+1,27) | 2,90(+1,31) | -0,23 | | NS |
| <u>CX3CL1</u> | 11,52(+6,31) | 12,99(+8,29) | -0,17 | | NS |
| <u>CXCL1</u> | 15,73(+15,41) | 18,09(+14,20) | -0,20 | | NS |
| <u>CXCL2</u> | 3,10(+2,32) | 1,27(+1,02) | 1,29 | | NS |
| <u>CXCL5</u> | 3,50(+0,70) | 4,01(+0,81) | -0,19 | | NS |
| <u>CXCR3</u> | 0,95(+0,50) | 0,61(+0,27) | 0,65 | | NS |
| <u>CXCR4</u> | 3,22(+3,77) | 1,83(+0,79) | 0,81 | | NS |
| <u>DAPK1</u> | 2,27(+0,55) | 2,56(+0,47) | -0,18 | | NS |
| <u>DAPK2</u> | 1,12(+0,19) | 1,10(+0,34) | 0,02 | | NS |
| <u>DFFA</u> | 0,78(+0,26) | 0,77(+0,16) | 0,02 | | NS |
| <u>DFFB</u> | 0,72(+0,25) | 0,97(+0,30) | -0,43 | | NS |
| <u>DTX2</u> | 9,37(+4,26) | 11,0(+61,95) | -0,24 | | NS |
| <u>EDG3</u> | 0,51(+0,24) | 0,57(+0,24) | -0,15 | | NS |
| <u>FADD</u> | 1,15(+0,49) | 1,55(+0,44) | -0,44 | | NS |
| <u>FOS</u> | 28,95(+32,19) | 14,87(+13,27) | 0,96 | | NS |
| <u>FOSL1</u> | 3,36(+2,31) | 1,34(+0,80) | 1,33 | | NS |
| <u>FOSL2</u> | 4,55(+2,06) | 4,52(+1,39) | 0,01 | | NS |
| <u>GADD45A</u> | 2,19(+0,95) | 1,97(+0,56) | 0,16 | | NS |
| <u>GAPDH</u> | 28,65(+13,71) | 29,73(+7,59) | -0,05 | | NS |
| <u>GATA3</u> | 0,26(+0,14) | 0,28(+0,17) | -0,10 | | NS |
| <u>GFI1</u> | 5,02(+2,54) | 5,40(+1,48) | -0,11 | NS | |
| <u>IGF1R</u> | 5,33(+2,08) | 5,12(+1,21) | 0,06 | NS | |

| | | | | | |
|----------------|---------------|---------------|-------|---------------------|----|
| <u>IL10</u> | 0,89(+0,38) | 1,23(+0,31) | -0,46 | Não Significante | NS |
| <u>IL10RA</u> | 4,84(+4,98) | 1,64(+0,71) | 1,56 | | NS |
| <u>IL10RB</u> | 3,98(+1,01) | 4,33(+0,97) | -0,12 | | NS |
| <u>IL11</u> | 0,30(+0,08) | 0,35(+0,11) | -0,24 | | NS |
| <u>IL11RA</u> | 2,00(+1,50) | 1,44(+0,39) | 0,47 | | NS |
| <u>IL12A</u> | 1,22(+0,45) | 0,94(+0,12) | 0,38 | | NS |
| <u>IL12RB2</u> | 0,45(+0,15) | 0,48(+0,16) | -0,09 | | NS |
| <u>IL13RA1</u> | 3,98(+1,83) | 5,64(+1,10) | -0,50 | | NS |
| <u>IL17C</u> | 0,89(+0,54) | 0,89(+0,40) | 0,01 | | NS |
| <u>IL17F</u> | 0,89(+0,21) | 0,91(+0,27) | -0,02 | | NS |
| <u>IL18</u> | 1,33(+1,32) | 1,49(+1,13) | -0,16 | | NS |
| <u>IL18BP</u> | 0,21(+0,10) | 0,17(+0,09) | 0,32 | | NS |
| <u>IL1A</u> | 8,65(+7,00) | 9,20(+2,65) | -0,09 | | NS |
| <u>IL1B</u> | 11,49(+4,93) | 12,69(+2,37) | -0,14 | | NS |
| <u>IL1R2</u> | 5,58(+2,96) | 4,70(+3,33) | 0,25 | | NS |
| <u>IL1RN</u> | 54,13(+19,11) | 57,17(+16,49) | -0,08 | | NS |
| <u>IL2RA</u> | 0,91(+0,25) | 1,04(+0,34) | -0,18 | | NS |
| <u>IL2RG</u> | 2,18(+1,53) | 3,91(+2,85) | -0,84 | | NS |
| <u>IL4R</u> | 12,44(+4,91) | 16,59(+3,72) | -0,42 | | NS |
| <u>IL5</u> | 0,67(+0,18) | 0,61(+0,08) | 0,13 | | NS |
| <u>IL5RA</u> | 0,18(+0,07) | 0,15(+0,04) | 0,27 | | NS |
| <u>IL6</u> | 1,36(+1,51) | 0,40(+0,45) | 1,77 | | NS |
| <u>IL6R</u> | 3,76(+1,51) | 4,42(+0,86) | -0,23 | | NS |
| <u>IL8</u> | 5,27(+4,71) | 12,34(+18,33) | -1,23 | | NS |
| <u>IL8RA</u> | 2,14(+0,73) | 2,16(+0,64) | -0,01 | | NS |
| <u>IL8RB</u> | 5,30(+2,61) | 6,80(+2,53) | -0,36 | | NS |
| <u>IL9</u> | 0,48(+0,18) | 0,41(+0,04) | 0,23 | | NS |
| <u>IRF1</u> | 6,88(+1,74) | 7,02(+2,41) | -0,03 | | NS |
| <u>ITGAE</u> | 2,80(+0,48) | 2,38(+0,20) | 0,24 | | NS |
| <u>JAG1</u> | 18,64(+9,44) | 24,73(+4,49) | -0,41 | | NS |
| <u>JAK1</u> | 2,48(+1,19) | 2,51(+0,23) | -0,01 | | NS |
| <u>JAK2</u> | 12,96(+7,79) | 8,58(+4,30) | 0,60 | | NS |
| <u>JAK3</u> | 1,65(+0,51) | 1,33(+0,20) | 0,31 | NS | |
| <u>JUN</u> | 3,30(+2,57) | 1,82(+0,21) | 0,86 | NS | |

| | | | | | |
|------------------|---------------|---------------|-------|--------------------------------|----|
| JUNB | 65,39(+22,37) | 59,69(+4,69) | 0,13 | N ^o Significante | NS |
| JUND | 18,65(+8,31) | 15,68(+3,05) | 0,25 | | NS |
| LAG3 | 0,83(+0,49) | 0,56(+0,30) | 0,57 | | NS |
| LTA | 1,75(+0,85) | 1,33(+0,37) | 0,40 | | NS |
| LTBR | 6,26(+2,52) | 8,06(+2,22) | -0,36 | | NS |
| MAP2K7 | 5,85(+1,85) | 5,29(+0,53) | 0,14 | | NS |
| MAPK10 | 0,62(+0,19) | 0,79(+0,24) | -0,34 | | NS |
| MAPK8 | 2,26(+1,41) | 1,78(+0,28) | 0,35 | | NS |
| MAPK9 | 4,84(+1,63) | 3,66(+0,64) | 0,40 | | NS |
| NFATC2 | 0,57(+0,18) | 0,48(+0,12) | 0,24 | | NS |
| NFATC2IP | 3,88(+2,06) | 3,11(+2,19) | 0,32 | | NS |
| NFATC3 | 5,59(+2,49) | 5,83(+2,95) | -0,06 | | NS |
| NFATC4 | 5,42(+1,21) | 5,96(+3,09) | -0,14 | | NS |
| NFKB1 | 8,01(+2,50) | 8,04(+1,46) | -0,01 | | NS |
| NOL3 | 0,73(+0,21) | 0,89(+0,27) | -0,30 | | NS |
| PCGF2 | 2,53(+0,93) | 2,62(+0,33) | -0,05 | | NS |
| PF4 | 1,17(+0,94) | 0,91(+0,43) | 0,36 | | NS |
| PTPRC | 2,31(+1,68) | 2,73(+0,85) | -0,24 | | NS |
| PYCARD | 1,96(+1,02) | 1,42(+0,28) | 0,47 | | NS |
| RIPK1 | 0,74(+0,20) | 0,67(+0,07) | 0,14 | | NS |
| RIPK2 | 1,21(+0,96) | 0,83(+0,45) | 0,54 | | NS |
| RPS27A | 86,90(+18,56) | 82,93(+16,44) | 0,07 | | NS |
| SFTPD | 2,10(+0,99) | 2,66(+0,60) | -0,34 | | NS |
| SOCS1 | 1,35(+0,42) | 1,31(+0,57) | 0,04 | | NS |
| STAT1 | 10,91(+6,62) | 7,29(+0,59) | 0,58 | | NS |
| STAT4 | 0,61(+0,23) | 0,69(+0,26) | -0,16 | | NS |
| STAT6 | 23,48(+7,94) | 30,55(+9,73) | -0,38 | | NS |
| TFCP2 | 0,72(+0,25) | 0,73(+0,15) | -0,02 | | NS |
| TLR2 | 0,56(+0,17) | 0,73(+0,20) | -0,39 | | NS |
| TLR4 | 1,17(+0,51) | 1,00(+0,29) | 0,23 | | NS |
| TLR6 | 0,47(+0,32) | 0,48(+0,17) | -0,03 | | NS |
| TMED1 | 1,99(+1,01) | 1,69(+0,51) | 0,24 | | NS |
| TNF | 0,57(+0,21) | 0,48(+0,18) | 0,25 | NS | |
| TNFRSF10A | 1, (+,56) | 1,88(+0,28) | -0,16 | NS | |

| | | | | | |
|-----------|---------------|---------------|-------|---------------------|----|
| TNFRSF10B | 10,87(+3,91) | 8,03(+1,49) | 0,44 | Não Significante | NS |
| TNFRSF10C | 1,79(+0,61) | 1,53(+0,40) | 0,23 | | NS |
| TNFRSF12A | 1,06(+0,40) | 1,19(+0,66) | -0,17 | | NS |
| TNFRSF1A | 8,91(+3,91) | 11,23 (+2,54) | -0,33 | | NS |
| TNFRSF1B | 7,84(+3,05) | 7,05(+2,21) | 0,15 | | NS |
| TNFRSF25 | 7,18(+2,80) | 8,87(+4,56) | -0,31 | | NS |
| TNFRSF6B | 3,90(+1,31) | 3,34(+0,83) | 0,23 | | NS |
| TNFRSF7 | 25,24(+26,37) | 5,93(+4,27) | 2,09 | | NS |
| TNFRSF8 | 0,65(+0,27) | 0,45(+0,07) | 0,56 | | NS |
| TNFRSF9 | 0,25(+0,11) | 0,22(+0,13) | 0,16 | | NS |
| TP53BP2 | 1,23(+0,60) | 1,59(+0,65) | -0,38 | | NS |
| TP73L | 0,69(+0,62) | 1,10(+0,55) | -0,66 | | NS |
| TRADD | 15,56(+5,02) | 13,50(+2,73) | 0,21 | | NS |
| TRAF1 | 0,89(+0,35) | 0,91(+0,27) | -0,03 | | NS |
| TRAF3 | 0,51(+0,15) | 0,38(+0,16) | 0,44 | | NS |
| TRAF4 | 1,82(+0,51) | 1,99(+0,46) | -0,13 | | NS |
| YY1 | 7,21(+4,70) | 7,21(+0,96) | 0,00 | | NS |

4.3- CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS DA EXPRESSÃO GENÉTICA PELA TÉCNICA DO PCR EM TEMPO REAL

Devido ao fato da tecnologia do *microarray* ser de natureza semi-quantitativa, a determinação da expressão genética completa requer validação dos resultados. Para isso, a técnica do PCR em tempo real (SuperArray's *RT2 Real-Time™ Primer Sets*), foi selecionada. Os resultados obtidos pela verificação por PCR tempo real deve ter 70-90% de concordância com os dados observados com a técnica do *microarray*, para serem considerados válidos e confiáveis.

Utilizando-se uma mudança no limiar de expressão de 1,3 nossos resultados demonstraram que, a validação dos genes desse experimento exibiu uma concordância de no mínimo 70%. Os dados obtidos com o *microarray* demonstraram que um grande número de genes no grupo experimental estavam diferencialmente expressos com significância estatística e/ou biológica. Devido ao elevadíssimo custo e a grande quantidade de dados gerados com os experimentos de *microarray*,

decidiu-se que alguns critérios deveriam ser seguidos, na escolha de quais genes seriam escolhidos para validação por *PCR* em tempo real.

No grupo experimental (tecido gengival/sangue), o primeiro critério de escolha foi a significância estatística; genes que demonstram o valor de $p \leq 0,05$ foram selecionados (total de 116 genes). O segundo critério de escolha foi a significância biológica, genes com valor de $\log_2 \leq -1$ foram considerados como baixa expressão, e genes com valor de $\log_2 \geq 1$ foram considerados como elevada expressão. Portanto dos 116 genes pré-selecionados, selecionou-se somente 83 genes dos quais 40 apresentaram baixa expressão e 43 genes com elevada expressão.

No grupo controle (tecido gengival/sangue) os mesmos critérios foram seguidos, e 94 genes apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Desse total, 76 genes foram considerados como biologicamente relevantes (41 com baixa expressão e 35 com elevada expressão).

Para identificar a expressão genética no compartimento gengival que é único na periodontite, os genes diferencialmente expressos no tecido gengival dos pacientes com periodontite, relativo ao sangue e que não estavam expressos nos indivíduos do grupo controle, foram identificados.

As diferenças na expressão genética entre gengiva e sangue de indivíduos sem doença periodontal (grupo controle) provavelmente são atribuídas às diferenças dos dois compartimentos anatômicos, enquanto que aqueles que são únicos na periodontite provavelmente estão atribuídos a doença.

Por outro lado, as diferenças na expressão genética entre gengiva e sangue observada nos pacientes periodontais são atribuídas tanto as diferenças anatômicas, como ao processo da doença. As análises demonstraram diferenças na expressão genética de 19 genes, unicamente nas amostras gengivais do grupo com doença periodontal (não observada nas amostras gengivais do grupo controle), comparadas com as amostras de sangue. Do total de 19 genes, 7 eram relacionados ao mecanismo de apoptose, 7 a resposta de células T e 6 a inflamação (tabela 10).

Esses dados demonstraram a baixa expressão dos genes protetores da apoptose (anti-apoptose) tais como aqueles relacionados a família do BCL. Observou-se também no tecido gengival do grupo experimental, elevada expressão de quimiocinas, de genes pro-inflamatórios e de genes pró-apoptose.

Em resumo, da primeira análise realizada, tecido gengival *versus* sangue (pacientes do grupo PC e NP), os genes escolhidos para confirmação por *PCR* em

tempo real tinham que apresentar $p \leq 0,05$, $\log_2 \leq -1$ ou ≥ 1 e serem estatisticamente significantes somente no grupo experimental. Um total de 19 genes foram selecionados como demonstra a tabela 10 abaixo.

Tabela 10. Genes escolhidos para confirmação pela técnica do PCR em tempo real. Os genes abaixo estavam diferencialmente expressos somente nas amostras gengivais (G) de pacientes periodontais, comparadas as amostras de sangue (S) do mesmo grupo.

| Gene | Mecanismo | Razão G: S | Expressão | Valor de $P \leq 0,05$ |
|-----------------|--|------------|-------------------|------------------------|
| CASP3 | Efector das caspases | -2.9 | Baixa-expressão | 0.05 |
| FAS | Receptor da superfamília do TNF | -2.4 | | 0.05 |
| BCL2L1 | Membro da família BCL-2 | -2.3 | | 0.0001 |
| IL12RB1 | Receptor de IL12 | -1.9 | | 0.0001 |
| IL9 | Citocinas anti-apoptose | -1.9 | | 0.010 |
| IL17RA | Receptor de IL-17 | -1.5 | | 0.0001 |
| GPR44 | Receptor de proteína G | -1.3 | | 0.05 |
| MAF | Fator de transcrição | -1.1 | | 0.010 |
| NFATC1 | Fator de transcrição | -1.0 | | 0.0010 |
| BCL2 | Anti-apoptose e membro da família Bcl | -1.0 | | 0.0001 |
| FOS | proto-oncogene apoptótico | 1.7 | Elevada-expressão | 0.05 |
| JAK2 | Tyrosine kinase envolvida na sinalização de receptores de citocina | 2.0 | | 0.0010 |
| CARD6 | Caspase recruitment domain | 2.0 | | 0.0001 |
| FOSL1 | Membro da família FOS | 2.2 | | 0.005 |
| NFATC2IP | Fator de transcrição | 2.2 | | 0.0005 |
| BNIP3 | Membro da família BCL anti-apoptose | 2.4 | | 0.005 |
| IL6 | Citocinas pro-apoptótica | 2.4 | | 0.05 |
| CXCL2 | Quimiocina | 2.6 | | 0.005 |
| IL8 | Quimiocina | 2.8 | | 0.010 |

* teste t bicaudal

- genes relacionados à apoptose (6 genes)

- genes relacionados à resposta de células T (7 genes)
- genes relacionados à inflamação (6 genes)

Como nosso objetivo foi analisar e determinar genes que estavam alterados somente na doença periodontal, a segunda análise foi identificar quais genes estavam com baixa ou elevada expressão somente nos pacientes do grupo experimental. Para esse propósito, comparou-se a média da expressão genética do tecido gengival no grupo experimental *versus* a expressão genética do tecido gengival no grupo controle. Comparando a expressão genética em ambos os grupos, foram selecionados 19 genes (estatisticamente significantes) para confirmação usando PCR em tempo real. Os resultados demonstrados na tabela 11 revelaram que a comparação da expressão genética das amostras gengivais de pacientes experimentais e controle demonstraram que 14 genes diferencialmente expressos ($p \leq 0.05$). Entre eles, somente o TNFSF10 apresentou relevância biológica (mudança ≥ 2 vezes). A proteína codificada por esse gene é uma citocina que pertence a família do ligante do TNF, e está envolvida na indução da apoptose.

Tabela 11. Análise pro microarray dos genes diferencialmente expressos nas amostras gengivais de pacientes periodontais comparados com amostras gengivais de pacientes sem doença periodontal. \log_2 das razões da expressão genética em PC:NP estão abaixo representados, onde razão ≤ -1 foi considerada como baixa expressão, enquanto $\geq +1$ foi considerada como expressão elevada.

| GENE | Mecanismo | \log_2 Razão P:NP | Valor de P |
|---------|--------------------------------------|---------------------|------------|
| TNFSF10 | Membro da família do TNF | -1.02915 | 0.01 |
| BNIP3L | Membro da família do BCL2 | -0.81097 | 0.01 |
| CX3CR1 | Quimiocina | -0.81097 | 0.05 |
| TP53 | Gene da Apoptosis gene | -0.78588 | 0.01 |
| IL1R1 | Receptor de citocinas inflamatória | -0.73697 | 0.01 |
| SOCS4 | Supressor de sinalizador de citocina | -0.73697 | 0.05 |
| BCLAF1 | Membro da família do BCL2 | -0.71312 | 0.05 |

| | | | |
|-----------------------|---------------------------|----------|------|
| CEBPB | Mediador inflamatório | -0.59946 | 0.05 |
| SCYE1 | Membro da família do TNF | -0.53533 | 0.05 |
| BAG3 | Membro da família do BCL2 | -0.51457 | 0.05 |
| BNIP2 | Gene anti-apoptose | -0.51457 | 0.05 |
| BFAR | Gene anti-apoptose | -0.45403 | 0.05 |
| MCL1 | Membro da família do BCL2 | -0.45403 | 0.05 |
| CCL8 | Quimiocina | 0.831877 | 0.05 |

* T-test bicaudal

- genes relacionados à apoptose (8 genes)
- genes relacionados à resposta de células T (3 genes)
- genes relacionados à inflamação (3 genes)

Da comparação feita a partir da média tecido gengival/sangue no grupo experimental e da média tecido gengival/sangue no grupo controle, 19 genes foram avaliados pela técnica do *PCR* em tempo real. O *array* de *PCR* foi composto por 96 poços para 84 genes, 5 genes de manutenção, e 3 controles. Para validação dos resultados, RNA total das amostras de sangue e gengiva dos pacientes do grupo experimental foi submetido à análise *por PCR* em tempo real. Dos 19 genes originalmente identificados pela técnica do microarray somente 11 foram confirmados, conforme, pode-se observar, na tabela 12.

Os dados obtidos com *PCR* em tempo real (gengiva do grupo PC x sangue do grupo NP) demonstraram baixa expressão de dois genes protetores da apoptose (BCL2 e BCL2L1), fatores de transcrição (NFATC1 e NFATC2IP), receptores de citocinas (IL12RB1, IL17RA), quimiocina (CXCL2), e receptor de células Th2 (GPR44). Expressão elevada dos seguintes genes MAF, IL8, FOSL1 e IL-6 foi observada nas amostras de tecido gengival dos pacientes com doença periodontal. MAF, FOS e NFAT vem demonstrando desempenhar um importante papel na osteoclastogênese. A diferença na expressão genética desses genes observada nos pacientes periodontais representa uma observação importante.

Tabela 12. Resultado da análise por *PCR* em tempo real da expressão genética nas amostras de gengiva e sangue no grupo experimental. Log_2 das razão da expressão genética nos tecidos gengivais e no sangue estão abaixo representada.

| Gene | Log_2 | Expressão | Valor de $P \leq 0,05$ |
|----------|----------------|-------------------|------------------------|
| BCL2L1 | -6,32 | Baixa-expressão | 0,000001 |
| GPR44 | -5,69 | | 0,000001 |
| CXCL2 | -5,08 | | 0,001 |
| IL12RB1 | -4,73 | | 0,00001 |
| IL17RA | -3,80 | | 0,00001 |
| BCL2 | -3,38 | | 0,00001 |
| NFATC1 | -3,00 | | 0,00001 |
| NFATC2IP | -1,47 | | 0,0001 |
| MAF | 1,76 | Elevada-expressão | 0,001 |
| IL8 | 3,48 | | 0,01 |
| FOSL1 | 3,81 | | 0,0001 |
| IL6 | 3,83 | | 0,001 |

* teste t bicaudal

- genes relacionados à apoptose (2 genes)
- genes relacionados à resposta de células T (5 genes)
- genes relacionados à inflamação (5 genes)

Quando 14 genes (analisados por microarray) que exibiram diferenças estatisticamente significantes (gengiva PC *versus* gengiva NP) foram validados por *PCR* em tempo real, somente dois foram confirmados. Observou-se que expressão de BAG3 e BFAR nas amostras gengivais do grupo experimental era menor que a expressão no grupo controle (tabela 13). Adicionalmente, o gene TNFSF10, que quando analisado pela técnica do microarray demonstrou estar com baixa expressão

nas amostras gengivais do grupo experimental (relativas ao grupo controle), foi validados, apresentou somente significância biológica (Log_2 -3,76, $p < 0,07$).

Tabela 13. Análise por PCR em tempo real da expressão genética nas amostras de tecido gengival dos pacientes periodontais (PC) comparados com as amostras de pacientes saudáveis periodontalmente (NP). O log_2 das razões PC:NP estão abaixo demonstrados. O valor de P das comparações foi calculado por meio de teste t bicaudal.

| GENE | Log₂ | Valor de *$P \leq 0,05$ |
|-------------|------------------------|---|
| BAG3 | -10,64 | 0,001 |
| BFAR | -7,27 | 0,01 |

*Teste t bicaudal

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A gengiva é um local em que ocorrem eventos biológicos múltiplos e complexos, com uma grande proporção relacionada à resposta imune aos desafios microbiológicos e antigênicos diários. A compreensão desses eventos biológicos é crítica na elucidação da patogênese da doença periodontal e no desenvolvimento de terapias estratégicas.

Um dos caminhos para investigar esses eventos biológicos é estudar a expressão genética nos tecidos gengivais. O presente estudo objetivou investigar a expressão genética no tecido gengival de pacientes com periodontite crônica severa e comparar com a expressão genética do sangue do mesmo paciente, e de pacientes controle (periodontalmente saudáveis). Ao invés de estudar todos os genes humanos, numa ação global, nos escolhemos estudar 288 genes, os quais foram selecionados com base na probabilidade de serem expressos no meio ambiente inflamatório da periodontite. Esses 288 genes estão relacionados com os mecanismos de apoptose, resposta de células T e inflamação.

Apoptose desempenha um papel crítico na regulação da inflamação e na resposta imune do hospedeiro. Durante esse processo, uma série de eventos bioquímicos e morfológicos coordenados é induzida na célula afetada, resultando na sua morte, e na subsequente remoção por fagócitos. Estudos sugerem uma correlação positiva entre apoptose e doença periodontal (GAMONAL *et al.*, 2003, 2001; IMATANI 2004; BANTEL *et al.*, 2005; BROZOVIC *et al.*, (2006); BULUT *et al.*, 2006). Muitos patógenos intracelulares, incluindo bactérias, vírus e parasitas, exercem seus efeitos patogênicos modulando o processo de apoptose. Certos microrganismos possuem a habilidade de desencadear apoptose, enquanto outros suprimem a resposta apoptótica nas células afetadas, por meio da regulação de genes pró e anti-apoptose (BITKO; BARIK, 2001, GUINEY, 2005).

A indução de apoptose nas células do hospedeiro tem sido relacionada à patogênese da doença periodontal (BULUT *et al.*, 2006). Periodontogatógenos, incluindo a *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, e *Eikenelle Corrodens* induzem apoptose em um variedade de componentes celulares do periodonto (KURITA-OCHIAI, FUKUSHIMA, OCHIAI, 1997, GEATCH, *et al.*, 1999, SORKIN BC, NIEDERMAN, 1999).

Estudos *in vitro* sugerem o papel da apoptose na patogênese da periodontite. Entretanto, ainda permanecem desconhecidos quais mecanismos moleculares são responsáveis pela destruição periodontal. Acredita-se que provavelmente reações imuno-mediadas e efeitos citopáticos bacterianos diretos podem estar envolvidos (KATO, 1995, GRAVES, JIANG, GENCO, 2000, TONETTI, CORTELLINI, LANG, 1998).

Estudos realizados nas últimas duas décadas identificaram uma grande família de genes que previnem ou induzem a apoptose RIEDL; SHI (2004). A decisão entre vida e morte de uma célula é o resultado dessas duas forças oponentes (URNOWEY, 2006). Assim, a regulação da apoptose depende do desequilíbrio entre genes anti e pró-apoptose. Tem-se considerado que a regulação anormal do mecanismo de apoptose contribui para doenças auto-imunes tais como artite reumatóide, câncer, doenças virais, incluindo AIDS, e infecções bacterianas, como a doença periodontal (ZYCHLINSKY; SANSONETTI, 1997).

O presente estudo objetivou estudar o mecanismo de apoptose, por meio da investigação da expressão de genes que regulam este mecanismo de morte celular programada. Para tanto, nos utilizamos a tecnologia do microarray e do *real-time* PCR. O resultado da análise da expressão genética observada no tecido gengival dos pacientes periodontais (em relação à expressão genética do sangue desse mesmo grupo), demonstrou que 2 genes protetores da apoptose (BCL2 e BCL2L1) estavam baixamente expressos. Essa observação é muito importante e evidencia resultados prévios obtidos em pesquisas realizadas por nosso grupo, em que linfócitos T expostos ao *A. a.* apresentaram baixa expressão da proteína BCL2. (NALBANT; ZADEH 2002).

BCL-2 é membro de uma família de 15 proteínas encontradas nos mamíferos, que são divididas em 3 subfamílias:

1. Família BCL-2 (pró sobrevivência): Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 e A1
2. Família BAX (pró-apoptose): Bax, Bak and Bok
3. Família BH3 (pró-apoptose): Bad, Bid, Bik, Blk, Hrk, BNIP3 e BimL

BCL-2 é uma proteína pequena associada à membrana presente no interior das mitocôndrias, e é também o protótipo para uma família de genes e proteínas codificadas por esses genes (BULUT *et al.*, 2006). BCL-2 se liga à superfície da mitocôndria, bloqueando a liberação do citocromo C.

A liberação do citocromo C ativa a cascata das caspases, que são moléculas efetoras responsáveis pela apoptose. Outro importante membro da família do BCL-2 é BCL2L1, também conhecido como BCLXL. Essa proteína está localizada na membrana externa da mitocôndria e inibe a apoptose em diferentes tipos celulares, por meio da regulação da abertura de canais presentes nessa membrana. BCL2L1 também controla a produção de oxigênio reativo e a liberação do citocromo C.

Acredita-se que a proporção de da proteína BCL-2 em relação à proteína BAX, é muito importante na regulação da morte celular por apoptose. SAWA *et al.* (1999) investigaram uma série de proteínas relacionadas ao mecanismo de apoptose, tais como BCL2 e BCL2L1. Esse estudo comparou linfócitos obtidos de sítios com doença periodontal aos linfócitos encontrados no sangue desses mesmos pacientes. Os autores observaram que ambas as proteínas BCL2 e BCL2L1 foram fracamente detectadas nos linfócitos periodontais (comparados aos linfócitos sanguíneos). Estimou-se que a quantidade de BCL2 nos linfócitos periodontais era de 50% a 75% menor do que os linfócitos sanguíneos. Já a proporção da proteína BCL2L1 nos linfócitos periodontais foi estimada estar abaixo de 50% em comparação aos linfócitos sanguíneos.

Baseados em resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, nós hipotetizamos que alguns patógenos periodontais putativos, tais como o *A.a.*, induzem em larga escala ativação das células T antígeno não-específicas. A maioria dessas células é eliminada por apoptose, e as células sobreviventes desenvolvem-se numa população de células T regulatórias, posteriormente suprimindo a resposta das células T antígeno-específicas. Resultados anteriormente observados em nosso laboratório, também revelaram que potente estimulação antígeno não-específica leva à ativação de um grande número de células T, que se expandem tremendamente, enquanto produzem baixa quantidade de IL-2. Essa situação cria um requerimento massivo de IL-2, que por sua vez, pode limitar a expansão antígeno específica das células T (NALBANT *et al.*, 2003).

Células T regulatórias diferenciam-se em células efetoras por meio da elaboração de certas citocinas, como por exemplo IL-10 e TGF- β , que podem suprimir a resposta antígeno específica. O *A.a.* expressa uma variedade de citocinas citolíticas que promovem a interação FAS-FASL entre as células T e as células apresentadoras de antígeno. Como resultado, uma grande proporção de células T

que respondem a essa ativação são mortas por apoptose, eliminando potencialmente células T antígeno específicas ativadas. Devido a esse mecanismo evasivo, os patógenos são capazes de sobreviver e induzir estimulação persistente das células apresentadoras de antígeno, promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo IL-1 α e TNF- α , responsáveis pela ativação de osteoclastos e promovendo a destruição tecidual. As células T também contribuem para a ativação dos osteoclastos por meio da liberação de RANK-L. Assim, produtos imunoregulatórios do A.a. interferem no estabelecimento de uma imunidade estável do hospedeiro contra microrganismos e permitem que esse patógeno persista, enquanto a resposta inflamatória ativa mecanismos destrutivos do hospedeiro (NALBANT *et al.*, 2002, ABRAHAMS; KAMSTEEG; MOR, 2002, BROZOVIC *et al.*, 2006).

Quando comparamos diferenças na expressão genética observadas nas amostras de gengiva obtidas nos sítios periodontais com a expressão de tecido gengival de áreas sem doença periodontal, verificamos que somente 2 genes relacionados à apoptose, BFAR e BAG3 (genes anti-apoptose) demonstraram diferenças estatísticas (valor de $p \leq 0,05$) e biológicas ($\log 2$ fold <-1 ou $>+1$). Nossos resultados demonstram que ambos os genes estavam baixamente expressos nos pacientes com doença periodontal. Este é um resultado bastante importante, visto que a apoptose ocorre em maior número, em sítios com doença periodontal GAMONAL *et al.*, 2003, 2001; IMATANI 2004; BANTEL *et al.*, 2005; BROZOVIC *et al.*, 2006, BULUT *et al.*, 2006).

Entre os genes reguladores da apoptose, atenção especial tem sido dispensada ao estudo do gene BAG3. Esse gene anti-apoptose é membro da família BAG. Proteínas que dividem o domínio BAG são caracterizadas por sua interação com uma variedade de moléculas (proteínas de choque térmico, hormônios esteróides, receptores celulares, etc), envolvidas na regulação de determinados processos celulares, incluindo proliferação e apoptose (ROSATI *et al.*, 2007).

BAG 3 também conhecida como CAIR-1 ou BIS, forma um complexo com as proteínas de choque térmico (Hsp) 70, podem modular a apoptose interferindo na liberação do citocromo C, ou em outros eventos relacionados a esse mecanismo (ROTH *et al.*, 2003, ROSATI *et al.*, 2007).

CHIAPETTA *et al.* (2007) demonstraram recentemente em órgãos linfóides primários, em leucemias mieloblásticas, e em outros tipos celulares neoplásicos que a expressão de BAG3 sustenta o sinal celular, oferecendo resistência a terapias, por meio da infra-regulação da apoptose.

BFAR, também conhecido como gene inibidor bi-funcional da apoptose (BAR) pode inibir a apoptose, induzido por receptores da família do TNF (mecanismo extrínseco da apoptose), ou por mecanismo de apoptose mitocôndrio-dependente (mecanismo intrínseco). Dois principais mecanismos de indução de apoptose foram identificados: extrínseco e intrínseco (ROTH *et al.*, 2003).

O mecanismo extrínseco é representado pela família de receptores do TNF, que utilizam a interação de proteínas conhecidas como DD (domínio de morte) e DEDs (domínio efetores da morte) que ativam certas proteases da família das caspases, como por exemplo pró-caspase 8 e 10 (RIEDL ; SHI, 2004).

O mecanismo intrínseco da apoptose depende da mitocôndria, que libera proteínas ativadoras da cascata das caspases, e é governado por proteínas da família do BCL-2 como por exemplo BAX (funcionando como indutor) e Bcl-X_L (servindo como supressores da apoptose). Essa teoria é suportada por achados que demonstram que sub-unidades da caspase-8 são seqüestradas pelo complexo Bcl-X_L/BAR impedindo remoção posterior de substratos da caspase-8 e morte celular subsequente no contexto da apoptose induzida por Fas (ZHANG *et al.*, 2000).

A interação entre BAR e BCL-2 ou BCL2L1 pode possivelmente contribuir para as propriedades anti-apoptóticas da proteína BAR. Mais do que isso, a proteína BAR possui domínio que compartilha similaridade com o domínio DEDs , o qual media a ligação da caspase-8. Portanto, sugere-se que a proteína BAR atua como uma proteína *scaffold* que liga componentes dos mecanismos da apoptose intrínseco e extrínseco. BFAR ou BAR é um regulador da apoptose com características únicas, que não observadas em outros moduladores do mecanismo de morte celular por apoptose (ZHANG *et al.*, 2000; ROTH *et al.*, 2003).

Outra observação importante do presente estudo foi que interleucina-6 (IL-6) estava com expressão elevada nos tecidos periodontais. Existe uma série de evidências na literatura que reportam um aumento da quantidade de IL-6 nos sítios com doença periodontal (DUARTE *et al.*, 2007; TERNOVEN *et al.*; 2007, BABEL *et*

al., 2006). A IL-6 é uma citocina secretada principalmente por células Th2, monócitos, macrófagos, e células da medula óssea.

A função primária da IL-6 é promover a proliferação e diferenciação de células B em células plasma e secreção de anticorpos. Essa citocina também é conhecida como fator de estimulação de hepatócitos, pois estimula estas células a produzirem proteínas na fase aguda em resposta à inflamação. Estudos como os realizados por MOREIRA *et al.* (2007), demonstram que a IL-6 está aumentada em sítios com inflamação e provavelmente relaciona-se com uma série de mecanismos ainda desconhecidos, que regulam o processo inflamatório. Osteoblastos também secretam IL-6, que por sua vez estimula a formação de osteoclastos, e conseqüentemente a reabsorção óssea. Alguns medicamentos vêm sendo desenvolvidos para bloquear a IL-6 e prevenir processos de reabsorção óssea patológicos, como a osteoporose.

Como já foi previamente descrito, a IL-6 é um mediador envolvido na reabsorção óssea, secretada por macrófagos em resposta a moléculas microbianas específicas denominadas de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos). Esses PAMPs ligam-se a moléculas de detecção da imunidade inata, altamente importantes denominadas de receptores Toll-like (TLRs). Esses receptores estão presentes na superfície celular (ou em compartimentos intracelulares) e induzem sinais em cascata que determinam a produção e citocinas (PATIL, ROSSA, KIRKWOOD, 2006).

Periodontopatógenos putativos, especialmente o *A.a.* vêm sendo relacionados com a produção de IL-6 por macrófagos. Resultados observados por ROGER *et al.* (2007), depois da administração de LPS (obtidos de *A.a.*) em ratos, revelaram um aumento significativo do infiltrado inflamatório, da quantidade de IL-6, e também do número de osteoclastos no grupo LPS comparado ao grupo controle (sem LPS).

MOREIRA *et al.* (2007) estudando a expressão de IL-6 e sua correlação com a perda de inserção clínica periodontal em uma população de brasileiros, verificaram que a severidade da destruição periodontal era proporcional à quantidade de IL-6.

A destruição óssea, por meio da formação excessiva de osteoclastos, está associada com certas alterações, como por exemplo a deficiência de estrógeno e ao aumento de citocinas inflamatórias (MIYAURA *et al.*, 2003, KAWAK *et al.*, 2006) podendo causar doenças do tecido ósseo, como a periodontite.

Nossos resultados também demonstraram que o gene denominado de fator nuclear de células T ativadas (NFATc1), também relacionado a osteoclastogênese estava pouco expresso ($\log_2 -3,00$), nas amostras com doença periodontal. Proteínas que pertencem a essa família de fatores de transcrição, desempenham um papel central na resposta imune. O fator de transcrição de células T (Th1, Th2, Th3) ativadas tem sido identificado como um regulador fundamental da osteoclastogênese (ZHAO *et al.*, 2007).

Os osteoclastos, células que reabsorvem osso, desempenham um papel-chave tanto na remodelação óssea normal como na osteopenia em processos patológicos como artite, osteoporose e doença periodontal. Esse papel duplo dos osteoclastos depende do estabelecimento de características específicas de expressão genética, alcançadas por meio de uma rede de fatores de transcrição, tais como NFATc1 ativado e por citocinas osteoclastogênicas (ZHAO *et al.*, 2007).

A diferenciação dos osteoclastos é regulada por processos múltiplos e por meio de expressão genética diferencial. Agentes osteotrópicos, incluindo a IL-6 causam perda óssea pelo aumento da formação de osteoclastos (HOFBAUER *et al.*, 2000).

RANK-L, o qual é essencialmente uma citocina osteoclastogênica, recruta a proteína TRAF (TNF receptor-associated factor) por meio da ligação com seu receptor, RANK, na superfície de osteoclastos percussores. TRAF ativa uma série de fatores de transcrição, incluindo c-FOS, e o NFATc1 que por sua vez, são ativados pelo RANK-L e são importantes para a diferenciação dos osteoclastos (TEITELBAUM *et al.*, 2003)

NFATc1 pode induzir a diferenciação dos osteoclastos na ausência de RANKL. Assim NFATc1 é essencial na diferenciação dos osteoclastos (TAKAYANAGI *et al.*, 2002).

Nossos resultados demonstraram que entre os genes relacionados com o mecanismo de apoptose (confirmados por PCR em tempo real), o gene TNFSF10 apresentou somente significância biológica. TNFSF10 pode induzir apoptose em células tumorais, mas aparentemente não induz apoptose em células normais. A união dessa proteína com seu receptor, ativa outros genes como por exemplo CASP3 e CASP 8, (genes envolvidos na cascata das caspases promotores de apoptose (ZHANG *et al.*, 2000).

A partir da comparação entre os resultados para gengiva periodontal versus gengiva periodontalmente saudável os resultados de *microarray* demonstraram que 2 genes (SOCS4 e CEPEB) relacionados com Th1, Th2, e Th3 apresentaram diferenças estatística e biologicamente significantes. Entretanto, quando esses genes foram submetidos à validação por *real-time* PCR, SOCS4 não demonstrou nem significância biológica nem estatística. Somente o gene CEBPB apresentou expressão biologicamente significativa, como demonstra a tabela 16.

Genes relacionados à inflamação e receptores de citocinas também foram incluídos nesse experimento. Quando a expressão genética foi analisada por *microarray* no tecido gengival dos paciente do grupo experimental e controle, 4 genes (CX3CR1, IL1R1, SCYE1, CCL8) apresentaram significância tanto estatística como biológica. Porém esses mesmos genes, ao serem validados por PCR em tempo real, somente CX3CR1 e IL1R1 apresentaram somente significância biológica. Ambos os genes estavam fracamente expressos.

CONCLUSÃO

6.CONCLUSÃO

A determinação da expressão genética do tecido gengival e sangue de indivíduos com e sem doença periodontal é uma área de investigação promissora. Para demonstrar o papel da apoptose nas populações de Th1, Th2 e Th3 e sua influência na patogênese da doença periodontal, é de suma importância determinar quaisquer diferenças na expressão genética dessas células. A tecnologia do microarray permite análise simultânea de um grande número de genes, fornecendo assim dados compreensíveis em relação a diferenças que podem estar relacionadas com à patogênese da doença periodontal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrahams VM, Kamsteeg M, Mor G. The Fas/Fas ligand system and cancer: immune privilege and apoptosis. *Mol Biotechnol.* 2003 Sep;25(1):19-30.
2. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunology.* 2004 Mar;5(3):266-71.
3. Araki M, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Abiko Y. Monitoring of dnaK gene expression in *Porphyromonas gingivalis* by oxygen stress using DNA microarray. *J Oral Sci.* 2004 Jun;46(2):93-100.
4. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol. / the American Academy of Periodontology.* 1999 Dec;4(1):1-6.
5. Azuma K, Shichijo S, Takedatsu H, Komatsu N, Sawamizu H, Itoh K. Heat shock cognate protein 70 encodes antigenic epitopes recognised by HLA-B4601-restricted cytotoxic T lymphocytes from cancer patients. *Br J Cancer.* 2003 Sep 15;89(6):1079-85.
6. Babel N, Cherepnev G, Babel D, Tropmann A, Hammer M, Volk HD, et al. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2006 Dec;77(12):1978-83.
7. Bantel H, Beikler T, Flemmig TF, Schulze-Osthoff K. Caspase activation is involved in chronic periodontitis. *FEBS letters.* 2005 Oct 24;579(25):5559-64.
8. Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Redini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2007 May 29.
9. Bitko V, Barik S. An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus. *J Cell Biochem.* 2001;80(3):441-54.
10. [Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet.* 1999 Jan;21(1 Suppl):33-7.
11. Brozovic S, Sahoo R, Barve S, Shiba H, Uriarte S, Blumberg RS, et al. *Porphyromonas gingivalis* enhances FasL expression via up-regulation of NFkappaB-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cells. *Microbiol. (Reading, England).* 2006 Mar;152(Pt 3):797-806.
12. Bulut S, Uslu H, Ozdemir BH, Bulut OE. Expression of caspase-3, p53 and Bcl-2 in generalized aggressive periodontitis. *Head Face Med.* 2006;2:17.

13. Carinci F, Piattelli A, Guida L, Perrotti V, Laino G, Oliva A, et al. Effects of Emdogain on osteoblast gene expression. *Oral Dis*. 2006 May;12(3):329-42.
14. Cerwenka A, Carter LL, Reome JB, Swain SL, Dutton RW. In vivo persistence of CD8 polarized T cell subsets producing type 1 or type 2 cytokines. *J Immunol*. 1998 Jul 1;161(1):97-105.
15. Chiappetta G, Ammirante M, Basile A, Rosati A, Festa M, Monaco M, et al. The antiapoptotic protein BAG3 is expressed in thyroid carcinomas and modulates apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Clin Endocrinology Metab*. 2007 Mar;92(3):1159-63.
16. Cohen JJ. Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hospital practice (Office ed)*. 1993 Dec 15;28(12):35-43.
17. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Review Immunol*. 1992;10:267-93.
18. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today*. 1993 Mar;14(3):126-30.
19. Gamonal J, Bascones A, Acevedo A, Blanco E, Silva A. Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry. *J Periodontol*. 2001 Apr;72(4):517-25.
20. Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, et al. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2003 Jul;30(7):616-23.
21. Geatch DR, Harris JI, Heasman PA, Taylor JJ. In vitro studies of lymphocyte apoptosis induced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Journal Periodontal Res*. 1999 Feb;34(2):70-8.
22. Gemmell E, Drysdale KE, Seymour GJ. Gene expression in splenic CD4 and CD8 cells from BALB/c mice immunized with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*. 2006 Apr;77(4):622-33.
23. Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol*. 2000 Nov 1;165(9):4773-7.
24. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jan;2(1):46-53.
25. Graves DT, Jiang Y, Genco C. Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. *Curr Opin Infect Dis*. 2000 Jun;13(3):227-32.

26. Gronert K, Kantarci A, Levy BD, Clish CB, Odparlik S, Hasturk H, et al. A molecular defect in intracellular lipid signaling in human neutrophils in localized aggressive periodontal tissue damage. *J Immunol.* 2004 Feb 1;172(3):1856-61.
27. Guiney DG. The role of host cell death in Salmonella infections. *Curr Topics Microbiol immunol.* 2005;289:131-50.
28. Haffajee AD, Socransky SS. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontol* 2000. 2006;42:7-12.
29. Hakki SS, Balci B, Hakki EE, Yilmaz E, Nohutcu RM. Identification of the difference in extracellular matrix and adhesion molecules of cultured human gingival fibroblasts versus juvenile hyaline fibromatosis gingival fibroblasts using cDNA microarray analysis. *J Periodontol.* 2005 Dec;76(12):2244-53.
30. Hamdy NA. Targeting the RANK/RANKL/OPG signaling pathway: a novel approach in the management of osteoporosis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2007 Apr;8(4):299-303.
31. Hirschfeld L, Wasserman B. A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *J Periodontol.* 1978 May;49(5):225-37.
32. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000 Jan;15(1):2-12.
33. Imatani T, Kato T, Okuda K, Yamashita Y. Histatin 5 inhibits apoptosis in human gingival fibroblasts induced by porphyromonas gingivalis cell-surface polysaccharide. *Euro J Med Res.* 2004 Nov 29;9(11):528-32.
34. Jotwani R, Palucka AK, Al-Quotub M, Nouri-Shirazi M, Kim J, Bell D, et al. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo, and in vitro studies. *J Immunol.* 2001 Oct 15;167(8):4693-700.
35. Kato S, Muro M, Akifusa S, Hanada N, Semba I, Fujii T, et al. Evidence for apoptosis of murine macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *Infect Immun.* 1995 Oct;63(10):3914-9.
36. Kawai T, Eisen-Lev R, Seki M, Eastcott JW, Wilson ME, Taubman MA. Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):2102-9.
37. Kim DM, Ramoni MF, Nevins M, Fiorellini JP. The gene expression profile in refractory periodontitis patients. *J Periodontol.* 2006 Jun;77(6):1043-50.

38. Kolodrubetz D, Spitznagel J, Jr., Wang B, Phillips LH, Jacobs C, Kraig E. cis Elements and trans factors are both important in strain-specific regulation of the leukotoxin gene in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. 1996 Sep;64(9):3451-60.
39. Kuo WP, Jenssen TK, Butte AJ, Ohno-Machado L, Kohane IS. Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2002 Mar;18(3):405-12.
40. Kuo WP, Jenssen TK, Park PJ, Lingen MW, Hasina R, Ohno-Machado L. Gene expression levels in different stages of progression in oral squamous cell carcinoma. *Proceedings / AMIA Annual Symposium*. 2002:415-9.
41. Kuo WP, Whipple ME, Jenssen TK, Todd R, Epstein JB, Ohno-Machado L, et al. Microarrays and clinical dentistry. *J Am Dent Assoc. (1939)*. 2003 Apr;134(4):456-62.
42. Kuo WP, Kim EY, Trimarchi J, Jenssen TK, Vinterbo SA, Ohno-Machado L. A primer on gene expression and microarrays for machine learning researchers. *J Biomed Inform*. 2004 Aug;37(4):293-303.
43. Kuo WP, Whipple ME, Sonis ST, Ohno-Machado L, Jenssen TK. Gene expression profiling by DNA microarrays and its application to dental research. *Oral Oncol*. 2002 Oct;38(7):650-6.
44. Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K. Butyric acid-induced apoptosis of murine thymocytes, splenic T cells, and human Jurkat T cells. *Infect Immun*. 1997 Jan;65(1):35-41.
45. Kurita-Ochiai T, Ochiai K. Immunosuppressive factor from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* down regulates cytokine production. *Infect Immun*. 1996 Jan;64(1):50-4.
46. Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K. Lipopolysaccharide stimulates butyric acid-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun*. 1999 Jan;67(1):22-9.
47. Kwak HB, Yang D, Ha H, Lee JH, Kim HN, Woo ER, et al. Tanshinone IIA inhibits osteoclast differentiation through down-regulation of c-Fos and NFATc1. *Exp Mol Med*. 2006 Jun 30;38(3):256-64.
48. Lally ET, Golub EE, Kieba IR. Identification and immunological characterization of the domain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin that determines its specificity for human target cells. *J Biol Chem*. 1994 Dec 9;269(49):31289-95.

49. Lally ET, Kieba IR, Demuth DR, Rosenbloom J, Golub EE, Taichman NS, et al. Identification and expression of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. *Biochem Biophysical Res Commun*. 1989 Feb 28;159(1):256-62.
50. Lane N, Armitage GC, Loomer P, Hsieh S, Majumdar S, Wang HY, et al. Bisphosphonate therapy improves the outcome of conventional periodontal treatment: results of a 12-month, randomized, placebo-controlled study. *J Periodontol*. 2005 Jul;76(7):1113-22.
51. Lee M, Trent JM, Bittner ML. Optimization of oligonucleotide microarray fabricated by spotting 65-mer. *Anal Biochem*. 2007 Jun 8.
52. Lee ML, Kuo FC, Whitmore GA, Sklar J. Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Aug 29;97(18):9834-9.
53. Loe H, Silness J. Periodontal Disease in Pregnancy. I. Prevalence and Severity. *Acta Odontol Scand*. 1963 Dec;21:533-51.
54. Loe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*. 1986 May;13(5):431-45.
55. Mahamed DA, Marleau A, Alnaeeli M, Singh B, Zhang X, Penninger JM, et al. G(-) anaerobes-reactive CD4+ T-cells trigger RANKL-mediated enhanced alveolar bone loss in diabetic NOD mice. *Diabetes*. 2005 May;54(5):1477-86.
56. Mangan DF, Wahl SM. Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J Immunol*. 1991 Nov 15;147(10):3408-12.
57. Mao S, Park Y, Hasegawa Y, Tribble GD, James CE, Handfield M, et al. Intrinsic apoptotic pathways of gingival epithelial cells modulated by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol*. 2007 Apr 5.
58. McCormick RK. Osteoporosis: integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Altern Med Rev*. 2007 Jun;12(2):113-45.
59. McFall WT, Jr. Tooth loss in 100 treated patients with periodontal disease. A long-term study. *J Periodontol*. 1982 Sep;53(9):539-49.
60. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000 Nov;71(11):1699-707.

61. Milward MR, Chapple IL, Wright HJ, Millard JL, Matthews JB, Cooper PR. Differential activation of NF-kappaB and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens. *Clin Exp Immunol.* 2007 May;148(2):307-24.
62. Miyaura C, Inada M, Matsumoto C, Ohshiba T, Uozumi N, Shimizu T, et al. An essential role of cytosolic phospholipase A2alpha in prostaglandin E2-mediated bone resorption associated with inflammation. *J Exp Medicine.* 2003 May 19;197(10):1303-10.
63. Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi SA, Costa JE, Gomes RS, et al. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol.* 2007 Apr;148(1):119-26.
64. Nalbant A, Chen C, Wang Y, Zadeh HH. Induction of T-cell apoptosis by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* mutants with deletion of *ItxA* and *cdtABC* genes: possible activity of GroEL-like molecule. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 Dec;18(6):339-49.
65. Nalbant A, Zadeh HH. Evidence for apoptosis of the majority of T cells activated in vitro with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2000 Oct;15(5):290-8.
66. Nalbant A, Zadeh HH. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces apoptosis of T lymphocytes by the Fas and Fas ligand pathway. *Oral Microbiol Immunol.* 2002 Oct;17(5):277-84.
67. Novack DV, Yin L, Hagen-Stapleton A, Schreiber RD, Goeddel DV, Ross FP, et al. The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 2003 Sep 1;198(5):771-81.
68. Ohguchi M, Ishisaki A, Okahashi N, Koide M, Koseki T, Yamato K, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* toxin induces both cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis. *Infect Immun.* 1998 Dec;66(12):5980-7.
69. Orima K, Yamazaki K, Aoyagi T, Hara K. Differential expression of costimulatory molecules in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *Clin Exp Immun.* 1999 Jan;115(1):153-60.
70. Patil C, Rossa C, Jr., Kirkwood KL. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol.* 2006 Dec;21(6):392-8.
71. Pickett CL, Whitehouse CA. The cytolethal distending toxin family. *Trends in microbiology.* 1999 Jul;7(7):292-7.

72. Prud'homme GJ, Piccirillo CA. The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2000 Feb;14(1):23-42.
73. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* 1994 Jan;124(1-2):1-6.
74. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews.* 2004 Nov;5(11):897-907.
75. Rodrigues PH, Progulske-Fox A. Gene expression profile analysis of *Porphyromonas gingivalis* during invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infect Immunity.* 2005 Sep;73(9):6169-73.
76. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2007 Mar;78(3):550-8.
77. Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *The Journal of experimental medicine.* 2001 Jan 15;193(2):F5-9.
78. Rosati A, Ammirante M, Gentilella A, Basile A, Festa M, Pascale M, et al. Apoptosis inhibition in cancer cells: A novel molecular pathway that involves BAG3 protein. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007 Mar 15.
79. Roth W, Kermer P, Krajewska M, Welsh K, Davis S, Krajewski S, et al. Bifunctional apoptosis inhibitor (BAR) protects neurons from diverse cell death pathways. *Cell death and differentiation.* 2003 Oct;10(10):1178-87.
80. Sabeti M, Simon J, Kermani V, Valles Y, Rostein I. Detection of receptor activator of NF-kappa beta ligand in apical periodontitis. *J Endod.* 2005 Jan;31(1):17-8.
81. Sawa T, Nishimura F, Ohyama H, Takahashi K, Takashiba S, Murayama Y. In vitro induction of activation-induced cell death in lymphocytes from chronic periodontal lesions by exogenous Fas ligand. *Infection and immunity.* 1999 Mar;67(3):1450-4.
82. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (New York, NY).* 1995 Oct 20;270(5235):467-70.
83. Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2006;40:77-93.
84. Scott DA, Kaper JB. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect Immunity.* 1994 Jan;62(1):244-51.

85. Sebastiani P, Yu YH, Ramoni MF. Bayesian machine learning and its potential applications to the genomic study of oral oncology. *Adv Dental Res*. 2003 Dec;17:104-8.
86. Serino G, Rosling B, Ramberg P, Hellstrom MK, Socransky SS, Lindhe J. The effect of systemic antibiotics in the treatment of patients with recurrent periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001 May;28(5):411-8.
87. Serino G, Rosling B, Ramberg P, Socransky SS, Lindhe J. Initial outcome and long-term effect of surgical and non-surgical treatment of advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2001 Oct;28(10):910-6.
88. Shenker BJ, Hoffmaster RH, McKay TL, Demuth DR. Expression of the cytolethal distending toxin (Cdt) operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: evidence that the CdtB protein is responsible for G2 arrest of the cell cycle in human T cells. *J Immunol*. 2000 Sep 1;165(5):2612-8.
89. Shenker BJ, Hoffmaster RH, Zekavat A, Yamaguchi N, Lally ET, Demuth DR. Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle. *J Immunol*. 2001 Jul 1;167(1):435-41.
90. Shenker BJ, McKay T, Datar S, Miller M, Chowhan R, Demuth D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells. *J Immunol*. 1999 Apr 15;162(8):4773-80.
91. Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol Scand*. 1964 Feb;22:121-35.
92. Sorkin BC, Niederman R. Short chain carboxylic acids decrease human gingival keratinocyte proliferation and increase apoptosis and necrosis. *J Clin Periodontol*. 1998 Apr;25(4):311-5.
93. Steinberg T, Dannewitz B, Tomakidi P, Hoheisel JD, Mussig E, Kohl A, et al. Analysis of interleukin-1beta-modulated mRNA gene transcription in human gingival keratinocytes by epithelia-specific cDNA microarrays. *J Periodontal Res*. 2006 Oct;41(5):426-46.
94. Stevens MK, Latimer JL, Lumbley SR, Ward CK, Cope LD, Lagergard T, et al. Characterization of a *Haemophilus ducreyi* mutant deficient in expression of cytolethal distending toxin. *Infect Immun*. 1999 Aug;67(8):3900-8.
95. Sugai M, Kawamoto T, Peres SY, Ueno Y, Komatsuzawa H, Fujiwara T, et al. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus*

- actinomycetemcomitans is a cytolethal distending toxin. *Infect Immun*. 1998 Oct;66(10):5008-19.
96. Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T, et al. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunology*. 2006 Aug;18(8):1197-209.
97. Taichman NS, Dean RT, Sanderson CJ. Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immunity*. 1980 Apr;28(1):258-68.
98. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med (Berlin, Germany)*. 2005 Mar;831(3):170-9.
99. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002 Dec;3(6):889-901.
100. Teng YT. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)-mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infect Immun*. 2002 Sep;70(9):5269-73.
101. Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(4):237-52.
102. Teng YT. Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 1--innate and humoral immunity and the periodontium. *J Dent Res*. 2006 Mar;85(3):198-208.
103. Teng YT. Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 2--T-cell-mediated immunity in the periodontium. *J Dent Res*. 2006 Mar;85(3):209-19.
104. Tervonen T, Raunio T, Knuutila M, Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 2007 May;34(5):377-83.
105. Thompson C, Powrie F. Regulatory T cells. *Curr Opin Pharmacol*. 2004 Aug;4(4):408-14.
106. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science (New York, NY)*. 1995 Mar 10;267(5203):1456-62.

107. Thompson CB. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? *Cell*. 1995 Jun 30;81(7):979-82.
108. Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol*. 1998 May;5(5):R97-103.
109. Tonetti MS, Cortellini D, Lang NP. In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. *Infect Immunity*. 1998 Nov;66(11):5190-5.
110. Urnowey S, Ansai T, Bitko V, Nakayama K, Takehara T, Barik S. Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: potential role of bacterial proteases in host signalling. *BMC Microbiol*. 2006;6:26.
111. Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol*. 2005 Jan;7(1):3-7.
112. Vernal R, Chaparro A, Graumann R, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol*. 2004 Dec;75(12):1586-91.
113. Wang PL, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M, et al. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jun 13;305(4):970-3.
114. Wang PL, Shirasu S, Shinohara M, Daito M, Oido M, Kowashi Y, et al. Induction of apoptosis in human gingival fibroblasts by a *Porphyromonas gingivalis* protease preparation. *Arch Oral Biol*. 1999 Apr;44(4):337-42.
115. Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol*. 1999;53:155-87.
116. Whitehouse CA, Balbo PB, Pesci EC, Cottle DL, Mirabito PM, Pickett CL. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infect Immunity*. 1998 May;66(5):1934-40.
117. Zadeh HH, Nalbant A, Park K. Large-scale early in vitro response to *actinobacillus actinomycetemcomitans* suggests superantigenic activation of T-cells. *J Dent Res*. 2001 Jan;80(1):356-62.
118. Zhang H, Xu Q, Krajewski S, Krajewska M, Xie Z, Fuess S, et al. BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 Mar 14;97(6):2597-602.
119. Zhao Q, Shao J, Chen W, Li YP. Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front Biosci*. 2007;12:2519-29.

-
120. Zuo J, Archer LA, Cooper A, Johnson KL, Holliday LS, Dolce C. Nuclear factor kappaB p65 phosphorylation in orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2007 Jun;86(6):556-9.
 121. Zychlinsky A, Sansonetti PJ. Apoptosis as a proinflammatory event: what can we learn from bacteria-induced cell death? *Trends Microbiol.* 1997 May;5(5):201-4.

