

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO:
INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS CLÍNICOS E GENÉTICOS**

Larissa Nadine Silva Dias

SAPIENTIA AEDIFICAT

2020

LARISSA NADINE SILVA DIAS

Associação entre periodontite e lúpus eritematoso sistêmico: investigação de aspectos clínicos e genéticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sabrina Garcia de Aquino

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Naila Francis Paulo de Oliveira

JOÃO PESSOA

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação

D541a Dias, Larissa Nadine Silva.

Associação entre periodontite e lúpus eritematoso sistêmico : investigação de aspectos clínicos e genéticos / Larissa Nadine Silva Dias. - João Pessoa, 2020.

51 f. : il.

Orientação: Sabrina Garcia de Aquino.

Coorientação: Naila Francis Paulo de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Lúpus eritematoso sistêmico. 2. Doenças periodontais. 3. Polimorfismo genético. I. Aquino, Sabrina Garcia de. II. Oliveira, Naila Francis Paulo de. III. Título.

UFPB/CCS

CDU 616.51(043)

LARISSA NADINE SILVA DIAS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO:
INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS CLÍNICOS E GENÉTICOS**

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª. Sabrina Garcia de Aquino
Orientador - UFPB



Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira
Examinador - UFPB



Profª Drª. Tarcília Aparecida da Silva
Examinador - UFMG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, principalmente Selma e José Vanderlei, meus pais e minha irmã Letícia que estiveram ao meu lado em todos os momentos. Meu muito obrigada aos demais familiares, que sempre me ajudaram e me incentivaram. Esta é mais uma vitória que oferto a vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ter me proporcionado perseverança e força todos esses dias para a conclusão do mestrado.

Aos meus pais, José Vanderlei e Selma e à minha irmã Letícia, que sempre me apoiaram, incentivaram e colaboraram para a realização deste sonho.

À minha avó, Idalice e minhas tias: Sônia, Sandra e Silvana, que contribuíram e sempre torceram pela concretização dos meus objetivos.

Ao meu noivo, André, que sempre me incentivou a me inscrever no mestrado, por todo amor e toda torcida.

À minha orientadora, professora Sabrina, pela paciência, compreensão, dedicação e ensinamentos. Obrigada pelos aprendizados que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal e obrigada, sobretudo, pela confiança depositada em mim.

À minha coorientadora, professora Naila, por ter abraçado o nosso projeto, por todos os ensinamentos de genética e de biologia molecular e por ter estado sempre disposta a ajudar.

À professora Isabella, pela contribuição nas análises estatísticas.

À professora Eutília, por toda a receptividade no serviço de Reumatologia do HULW.

Aos meus companheiros e amigos do laboratório: Viana, Marina e Ingrid, por terem me recebido tão bem e terem me ensinado com tanta paciência sobre todas as técnicas que utilizei. E à Rebeca, por todos os dias de luta no laboratório, durante a fase de coleta e pelas palavras de incentivo.

Aos meus colegas e amigos do mestrado, em especial Fabrício e Viana, que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado.

Às minhas amigas: Elayne, Luciana, Priscila, Raquel e Thayssa, que sempre torceram por mim.

Aos meus colegas de trabalho, que me ajudaram principalmente nos dias em que precisei me ausentar para cumprir as obrigações do mestrado.

Aos pacientes, que entenderam a importância da participação na pesquisa e confiaram no meu trabalho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: A associação entre a periodontite e lúpus eritematoso sistêmico (LES) tem sido baseada principalmente na fisiopatologia semelhante. Entretanto, os dados sobre a condição periodontal em pacientes com LES são controversos e os mecanismos envolvidos nesta associação ainda não são bem estabelecidos. **Objetivo:** Considerando a influência de fatores ambientais e genéticos na patogênese de doenças inflamatórias, este estudo investigou a contribuição dos polimorfismos genéticos relacionados à metilação: *DNMT3B* (rs2424913) e *MTHFR* (rs1801133) na periodontite e no LES. **Métodos:** 196 indivíduos de ambos os sexos foram distribuídos em quatro grupos de acordo com a condição sistêmica e periodontal: controle (n = 60), periodontite (n = 51), LES (n = 47) e LES + periodontite (n = 38). Os indivíduos com LES foram divididos de acordo com a atividade da doença (SLEDAI) em leve ou grave. A análise do polimorfismo foi realizada por PCR-RFLP utilizando DNA genômico obtido a partir de células da mucosa bucal. Os dados foram analisados pelos modelos exato de Fisher, qui-quadrado e regressão. **Resultados:** A condição periodontal foi similar nos indivíduos com periodontite e com LES + periodontite. Pacientes com LES + periodontite apresentaram um maior tempo de diagnóstico da doença em comparação aos pacientes com apenas LES (P = 0.001). Para o polimorfismo *DNMT3B*, os grupos periodontite, LES e LES leve + periodontite apresentaram maior frequência do alelo T e do genótipo TT em comparação ao controle (P < 0.05). As análises de regressão mostraram que o genótipo TT aumenta as chances de periodontite (6 vezes) ou LES (11 a 12 vezes). **Conclusão:** Pacientes com LES + periodontite apresentaram um maior tempo de diagnóstico do LES. O polimorfismo *DNMT3B* (rs2424913) está associado à periodontite, ao LES ou LES + periodontite.

Descritores: Lúpus Eritematoso Sistêmico; Doenças Periodontais; Polimorfismo Genético.

ABSTRACT

The association between periodontitis and SLE has been primarily based on the similar pathophysiology. However, there are controversial data concerning periodontal status in SLE patients, as well as the underlying mechanisms of PD and SLE association are still largely unknown. **Aim:** Considering the influence of environmental and genetic factors in the pathogenesis of inflammatory diseases, this study investigated the contribution of the methylation-related gene polymorphisms *DNMT3B* (rs2424913) and *MTHFR* (rs1801133) to periodontitis and SLE. **Methods:** Overall, 196 individuals of both sexes were allocated into four groups under assessment of systemic and periodontal status as follows: healthy control (n = 60), Periodontitis (n = 51), SLE (n = 47) and SLE + Periodontitis (n = 38). Individuals with SLE were stratified according to disease activity (SLEDAI) in mild or severe. Polymorphism analysis was performed through PCR-RFLP using genomic DNA from oral mucosa cells. The data were analyzed by Fisher's exact, chi-square test and regression models. **Results:** Periodontal status was similar in subjects with periodontitis and with SLE + periodontitis. SLE patients with periodontitis presented a longer SLE diagnoses in comparison to SLE only (P=0.001). For *DNMT3B* polymorphism, Periodontitis, SLE and Mild SLE + Periodontitis groups showed a higher frequency of T allele and TT genotypes compared to healthy controls (P<0.05). Regression analyses showed the TT genotype increases the odds of periodontitis (6-fold) or SLE (11- to 12-fold). **Conclusion:** SLE patients with periodontitis had a longer length of SLE. The *DNMT3B* (rs2424913) polymorphism was associated with periodontitis, and SLE alone or combined with periodontitis.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus; Periodontal Diseases; Genetic Polymorphism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNMT - DNA metiltransferase

DP - Doença periodontal

IL-1 β - Interleucina 1beta

IL-6 - Interleucina 6

LES - Lúpus eritematoso sistêmico

MTHFR - Metilenotetrahidrofolato redutase

PCR-RFLP - *Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorfism*

PGE2 - Prostaglandina E2

SLEDAI - *Systemic Lupus Erytematosus Disease Activity Index*

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Localização cromossômica do gene <i>MTHFR</i> .	16
Figura 2 - Ciclo do folato e da metionina.	16
Figura 3 - Localização cromossômica do gene <i>DNMT3B</i> .	17

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	<i>MTHFR</i>	16
1.2	<i>DNMT3B</i>	17
1.3	POLIMORFISMO GENÉTICO	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	CAPÍTULO 1	22
4	CONSIDERAÇÕES GERAIS	40
5	CONCLUSÃO	41
6	ANEXOS	47
6.1	ANEXO 1	47
6.2	ANEXO 2	48
6.3	ANEXO 3	49
7	APÊNDICES	50
7.1	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	50
7.2	FICHA PARA COLETA DE DADOS.....	52

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com o avanço das pesquisas na área de biologia molecular e genética, tem se confirmado o papel determinante da resposta inflamatória/imune do hospedeiro na manutenção da homeostase e no início e progressão de diversas desordens de caráter autoimune, inflamatório ou infeccioso. Entre estas, as doenças periodontais (DPs) e as doenças autoimunes, como a artrite reumatoide (AR) e o lúpus eritematoso sistêmico (LES), compartilham diversas semelhanças patológicas quanto aos mecanismos envolvidos na destruição tecidual (1–3).

A periodontite é caracterizada pela inflamação crônica dos tecidos de suporte dental, com formação de bolsa, perda de inserção e perda óssea em resposta a um biofilme predominantemente de anaeróbios Gram-negativos. Além do dano direto, a presença do biofilme disbiótico está associada a uma sucessão de eventos imunoinflamatórios agudos (gingivite) que podem se cronificar e favorecer a invasão tecidual com o colapso da homeostase subgingival e causar danos irreversíveis aos tecidos, a depender da resposta imune do hospedeiro (4).

A periodontite, juntamente com a cárie dentária, está entre as doenças bucais mais comuns e principais causas de perda dentária, com aproximadamente 10% da população mundial afetada por periodontite severa (5). O Brasil está entre os países nos quais a prevalência de periodontite apresenta-se significativamente maior do que a média global (20,4%) (6).

Atualmente, é bem estabelecido que o início da doença está relacionado à instalação de um biofilme disbiótico na superfície dentária (4); contudo, sua progressão depende de outros fatores incluindo: a condição de saúde sistêmica e comorbidades, hábitos de risco relacionados à periodontite, como o tabagismo bem como fatores ambientais, genéticos e epigenéticos (7). Isso porque estes fatores podem influenciar de forma decisiva a resposta imunoinflamatória do hospedeiro frente à agressão que, quando exacerbada, é a maior responsável pelo dano tecidual (7). Além disso, acredita-se que este estado hiperinflamatório pode não se restringir à bolsa periodontal, mas alcançar a circulação e afetar outros órgãos ou desordens sistêmicas, inclusive as doenças autoimunes (8).

O LES é uma doença inflamatória crônica de natureza autoimune que afeta o tecido conjuntivo de múltiplos órgãos e tecidos, principalmente as articulações, os órgãos internos e a pele e apresenta diversas manifestações clínicas. Como a periodontite, apresenta um caráter

multifatorial e é influenciado por fatores genéticos, ambientais, hormonais, epigenéticos e imunorregulatórios que podem agir sequencialmente ou simultaneamente no sistema imune e desencadeá-lo (2). Neste contexto, infecções crônicas, incluindo a periodontite, têm sido apontadas tanto como gatilhos como na cronicidade e atividade de doenças autoimunes incluindo artrite reumatoide (AR) e o LES (2,9).

A incidência mundial é alta, sendo as mulheres mais afetadas, com pico na meia idade e prevalência mundial do LES variando entre 1,2:1 e 15:1 entre mulheres e homens (10). No Brasil, uma alta incidência de LES (8,7 por 100.000/ano) foi encontrada, bem como uma prevalência de 98 por 100.000 habitantes (11,12).

O diagnóstico do LES é baseado nos critérios da *American College of Rheumatology* (ACR), devendo o indivíduo apresentar no mínimo quatro dos onze critérios: eritema malar, lesão discoide, fotossensibilidade, úlceras orais ou nasofaríngeas, artrite, serosite, comprometimento renal, alterações neurológicas, hematológicas, imunológicas e anticorpos antinucleares (13). No entanto, também é possível um indivíduo portar a doença e não apresentar quatro dos critérios de classificação, principalmente quando apresenta o anticorpo específico para LES e apenas uma manifestação clínica (14).

Normalmente, um conjunto de fatores: predisposição genética, influências orgânicas (a exemplo do estresse e da atividade hormonal) e fatores ambientais são os responsáveis por influenciar o desenvolvimento de doenças autoimunes. Dentre os fatores ambientais, podemos citar: infecções (bacterianas, virais ou parasitárias), medicamentos e produtos químicos e tóxicos, componentes dietéticos, exposições ocupacionais e tabagismo (15). Além destes fatores, a suscetibilidade genética representa um fundamental aspecto das doenças reumáticas. Embora um único fator de risco genético não seja responsável pelo desenvolvimento da enfermidade, uma combinação de variantes genéticas pode influenciar a suscetibilidade, o curso e a resposta à terapia (16).

O tratamento do LES normalmente baseia-se na supressão da resposta imune associada à terapia com corticosteróides, mas pode variar de acordo com os sintomas e evolução da doença (17). Entretanto, essa terapia imunossupressora tem sido relacionada a uma maior predisposição a infecções (18). Neste sentido, já foi demonstrada a presença de DP em 57,1% a 88% dos indivíduos portadores de LES (19–22) que pode estar relacionada a fatores ambientais e genéticos que contribuem também para a patogênese da periodontite (20). Considerando esta alta prevalência, bem como as semelhanças na patogênese, a associação entre LES e periodontite vem sendo investigada recentemente.

Assim, uma associação significativa entre história de DP e risco de LES foi observada (23), bem como um aumento significativo no risco de periodontite em pacientes com LES (24). É interessante mencionar que foi demonstrado o efeito benéfico do tratamento periodontal básico no controle da atividade do LES em pacientes com terapia imunossupressora a partir da verificação da redução do SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) (25). Ao mesmo tempo, este ainda é um assunto bastante controverso, considerando que alguns estudos observaram uma condição periodontal melhor em pacientes com LES (26), semelhante (21,27,28) ou pior, quando comparada a indivíduos sistemicamente saudáveis (20,29). Além disso, ainda são escassos os estudos que investigam os mecanismos biológicos envolvidos nesta associação.

Neste sentido, além do caráter multifatorial comum, o estado hiperinflamatório é considerado o principal elo de associação entre a periodontite e o LES. (24). Evidências mais recentes têm sugerido o papel da disbiose oral na associação da periodontite e o LES. Acredita-se que a resposta do hospedeiro ao biofilme disbiótico pode ser alterada por doenças sistêmicas devido ao maior aumento do estado hiperinflamatório comparado a uma condição normosistêmica (9,30). Além disso, a excessiva ativação de *Toll like receptor* (TLR)-2 e TLR-4 na periodontite tem sido associada a este desequilíbrio inflamatório, o que pode acelerar o início e a progressão do LES, onde a expressão de TLR-2 e TLR-4 também se encontra aumentada (31). Além do alto nível de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-18, alterações na atividade fagocítica também são observadas em ambas as doenças (2).

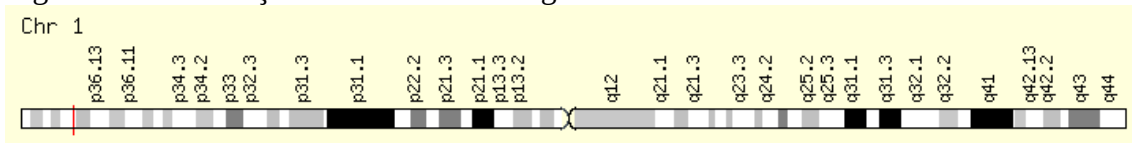
Na patogênese do LES, este quadro hiperinflamatório está relacionado a função anormal das células T, com a produção anormal de citocinas, diminuição da função citotóxica e aumento da resposta humoral (32). Este aumento da produção de citocinas e de autoanticorpos no LES está relacionado à hipometilação da região reguladora de DNA em células T (33). Alguns estudos sugerem a importância da metilação do DNA no desenvolvimento do LES e a hipometilação parece desempenhar um papel importante na etiologia desta doença (34). Também foi demonstrada a associação entre a hipometilação do DNA no LES e a diminuição da atividade enzimática das DNA metiltransferases (DNMTs) (35). Essa alteração na metilação pode ser causada por variações genéticas nas enzimas da via do folato/ homocisteína, as quais fornecem o grupo doador do radical metil para ser adicionado ao DNA (36), como também variações genéticas nas próprias enzimas DNMTs que conduzem o processo de metilação. Neste cenário, seria interessante investigar não apenas o grau de metilação, bem como o polimorfismo dos genes envolvidos na modulação da

metilação em pacientes portadores de LES e/ou periodontite; entre possíveis alvos de investigação, estão: o gene *MTHFR* (que participa do metabolismo do folato gerando o radical metil) e o gene *DNMT3B* (responsável por catalisar a transferência do radical metil nos nucleotídeos CpG). Alterações genéticas nestes genes já foram relatadas em alguns tipos de câncer e doenças inflamatórias (20,37–42).

1.1 *MTHFR*

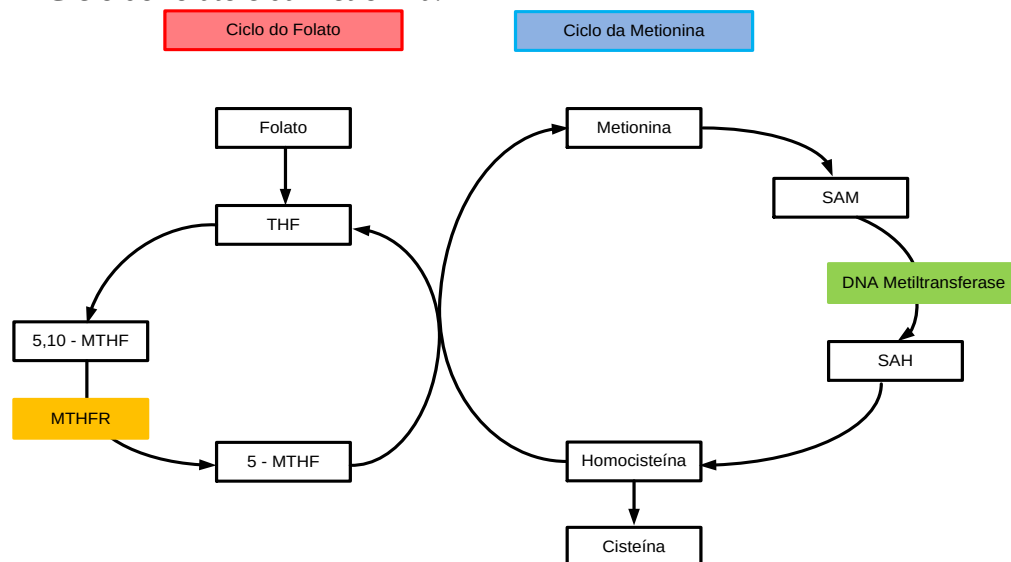
O locus do gene metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) está localizado no cromossomo 1, no final do braço curto (1p36.3) (Figura 1) (43). A enzima metilenotetrahidrofolato redutase é responsável por converter 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato, o que produz o radical metil a ser doado para a conversão de homocisteína em metionina (Figura 2) (44).

Figura 1 – Localização cromossômica do gene *MTHFR*.



Fonte: Gene Cards: Human Gene Database.

Figura 2 - Ciclo do folato e da metionina.



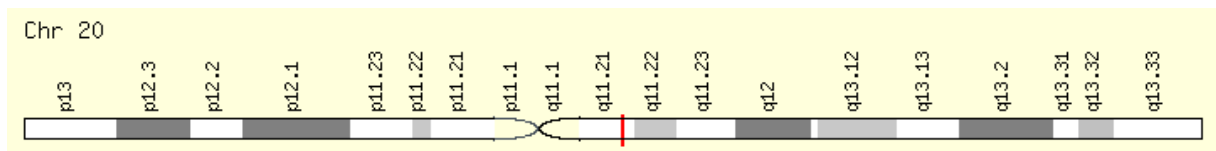
A atividade da enzima *MTHFR* é reduzida para cerca de 35% na presença de heterozigose (677CT) e cerca de 70% em homozigose (677TT) em relação ao genótipo normal (677CC) (45). A enzima codificada por esse gene é importante para o metabolismo do

folato (46). O folato e a vitamina B12 são necessários para a síntese da timina e a carência destes diminui a síntese de DNA (47). Nesta reação, o folato participa na forma de N5-N10-metilenotetraidrofolato, doando um radical $-CH_3$ (metil) à desoxiuridinamonofosfato (dUMP), transformando-a em timidinamonofosfato (dTMP), que será incorporada ao DNA. Já a vitamina B12 participa de forma indireta, atuando como coenzima da conversão de homocisteína em metionina, transformando o 5-metiltetraidrofolato em tetraidrofolato, a forma ativa de folato que participa da síntese de timina. Na ausência da vitamina B12, o folato vai se transformando em 5-metiltetraidrofolato, uma forma de transporte do folato inútil para a síntese do DNA. Se a síntese de DNA não for adequada, são observadas modificações do ciclo celular, retardo da duplicação e defeitos no reparo do DNA (47).

1.2 *DNMT3B*

O *locus* do gene DNA metiltransferase 3B (*DNMT3B*) está localizado no cromossomo 20, no braço longo (20q11.21) (Figura 3). A enzima codificada por este gene participa do processo de metilação do DNA.

Figura 3 - Localização cromossômica do gene *DNMT3B*.



Fonte: Gene Cards: Human Gene Database.

O processo de metilação do DNA representa uma modificação na qual um grupo metil (CH_3) é transferido da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 5 do dinucleotídeo CpG (citosina que precede uma guanina). Esse processo é conduzido pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), as quais se dividem em duas classes: metilases de manutenção, como a *DNMT1* e as envolvidas nos processos de metilação *de novo*, que acontecem em sítios sem indicação de metilação, ou seja, sem metilação anterior, como as *DNMT2*, *DNMT3A* e *DNMT3B* (48). Entre estas, a *DNMT3B* é considerada a principal DNA metiltransferase *de novo* ativa durante a implantação e está comprometida em doenças humanas com instabilidades cromossômicas e genômicas, incluindo doenças hereditárias e câncer (49).

Além disso, a metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG em células diferenciadas e possui função de extrema importância no silenciamento de elementos repetitivos no genoma, bem como na regulação da expressão gênica (50). Neste contexto, a transcrição gênica pode ser amplamente inibida com a metilação. Isso porque a presença do radical metil sobre o CpG pode inibir a ligação de fatores de transcrição a essas regiões, resultando na ausência ou na redução da transcrição gênica (51).

Além de alterações epigenéticas, como no perfil de metilação de genes que regulam a expressão de citocinas, por exemplo, tanto a periodontite quanto o LES apresentam também associações com polimorfismos genéticos em uma variedade de genes, incluindo os genes envolvidos no processo de metilação (20,42,52–54), sendo esta uma área interessante para se investigar a possível associação entre essas desordens inflamatórias, visto que ainda são escassas as evidências na literatura sobre a influência de polimorfismos no aumento do risco de periodontite em pacientes portadores de LES (20).

1.3 Polimorfismo genético

O polimorfismo genético é caracterizado pela coexistência de alelos múltiplos em um *locus* gênico. Um sítio onde existem alelos múltiplos como correspondentes estáveis da população é considerado polimórfico. Um alelo é considerado polimórfico se ele se apresentar em pelo menos 1% da população. A base para o polimorfismo entre os alelos são as diferentes mutações que podem acontecer na sequência de DNA. As mudanças em um *locus* incluem: 1- mudança na sequência de DNA, sem alterar a sequência de aminoácidos da proteína; 2- mudança na sequência de aminoácidos da proteína sem alterar a sua função; 3 - criação de proteínas com diferentes atividades; 4 - criação de proteínas mutantes que não são funcionais (55).

Muitas variantes de sequências diferentes podem existir em um determinado *locus* e, quando elas afetam o fenótipo, são evidentes, mas outras são ocultas por não terem efeito visível (56). Ainda não é bem elucidada a influência de polimorfismos no aumento do risco de periodontite em pacientes portadores de LES (20). Portanto, considerando o importante envolvimento de polimorfismos na patogênese destas duas desordens multifatoriais, maiores investigações sobre possíveis genes alvo que possam elucidar os mecanismos da associação entre periodontite e LES seriam interessantes, entre os quais os genes *MTHFR* e *DMNT3B*.

O polimorfismo C677T é uma mutação pontual de nucleotídeo único (SNP) que ocorre na posição 677 no gene *MTHFR*, substituindo a citosina por timina, sendo a substituição de aminoácidos uma mutação comum nesse gene. A mutação no éxon 4 do gene *MTHFR*, especificamente, gera a alteração do aminoácido alanina por valina na enzima *MTHFR*, reduzindo a sua atividade, o que pode estar relacionado à deficiência do folato em humanos (57). Neste sentido, foi relatado efeito deletério desse polimorfismo no metabolismo da homocisteína, levando à hiperhomocisteinemia e ao baixo nível plasmático de folato (58).

Apesar de a epidemiologia desse polimorfismo variar geograficamente e etnicamente (46), ele está associado a diversos tipos de câncer e doenças inflamatórias (40,46,59). Entretanto, ainda é pouco conhecida a relação do polimorfismo C677T no éxon 4 do gene *MTHFR* com a periodontite e o LES (37,42).

Já o polimorfismo -149C→T ocorre na região promotora do gene *DNMT3B* substituindo a citosina por timina. A enzima codificada por este gene participa do processo de metilação do DNA, podendo inibir a transcrição gênica (51). Este polimorfismo está associado ao aumento do risco de câncer, incluindo câncer de cabeça e pescoço (60) e em doenças autoimunes da tireoide (41).

Assim, o estudo dos polimorfismos genéticos possui extrema importância no mapeamento gênico e na procura de genes envolvidos em distúrbios comuns, apresentando grande aplicabilidade para a medicina personalizada. Esta representa um sistema que integra características moleculares e bioquímicas com os dados clínicos do paciente, possibilitando a previsibilidade da doença antes dos sinais e sintomas clínicos e permitindo maior enfoque na prevenção e na intervenção antes do avanço das doenças (61). Com isto, torna-se possível implementar políticas de saúde, diminuir custos com tratamentos e, conseqüentemente, trazer uma melhoria na atenção à saúde.

Neste contexto, a investigação de polimorfismos em genes que modulam o processo de metilação como os genes *MTHFR* e o *DNMT3B* pode ser interessante, visto o papel da hipometilação do DNA no aumento de citocinas e a produção de autoanticorpos por células T no LES (34) e as crescentes evidências da influência epigenética (com alterações no perfil de metilação) na periodontite e no LES (42,62–67).

Desse modo, considerando as evidências disponíveis sobre a possível associação entre a periodontite e o LES, sobretudo no que se refere à similaridade nos mecanismos de patogenicidade, bem como as controvérsias relativas à prevalência e severidade da periodontite em pacientes portadores de LES, o ainda reduzido número de estudos sobre esta

associação e a falta de informações sobre os mecanismos envolvidos, além da relevância do componente genético para o desenvolvimento do LES e da periodontite, o presente estudo pretende, por meio de análises clínicas e de alterações genéticas (mais especificamente, polimorfismos dos genes envolvidos na modulação da metilação: *DNMT3B* e *MTHFR*), trazer dados importantes sobre esta associação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a associação entre a periodontite e o LES no que se refere a aspectos clínicos e genéticos em pacientes portadores de LES e/ou periodontite.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a condição periodontal nos indivíduos com diferentes graus de atividade do LES (leve e grave) comparados a indivíduos sistemicamente saudáveis.
- b) Investigar pela técnica de RFLP-PCR (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorfism*) a presença do polimorfismo C677T do gene *MTHFR* em células epiteliais da mucosa bucal em pacientes portadores de LES e/ou periodontite comparados a indivíduos sistemicamente saudáveis com ou sem periodontite.
- c) Investigar pela técnica de RFLP-PCR a presença do polimorfismo -149C→T do gene *DNMT3B* em células epiteliais da mucosa bucal em pacientes portadores de LES e/ou periodontite comparados a indivíduos sistemicamente saudáveis com ou sem periodontite.

3 CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico *Lupus*.

***DNMT3B* (rs2424913) polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus alone and with co-existing periodontitis in a Brazilian population**

Larissa N. Silva Dias BDSc¹, Marina C Coêlho, BSc¹, Ingrid C Queiroz², Isabella L. Arrais³ Ribeiro, Darlene C Persuhn, PhD⁴; Eutilia A.M. Freire, PhD⁵; Naila F P de Oliveira, PhD^{1,4}; Sabrina G de Aquino, PhD^{1,6}

¹Postgraduate Program in Odontological Sciences, Centre of Health Sciences, Federal University of Paraíba - UFPB, João Pessoa, PB-Brazil

²School of Pharmacy, Centre of Health Sciences, Federal University of Paraíba - UFPB, João Pessoa, PB-Brazil

³Ribeirão Preto Medical School, Department of Public Health, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP- Brazil.

⁴Molecular Biology Department, Centre of Exact and Natural Sciences, Federal University of Paraíba - UFPB, João Pessoa, PB-Brazil

⁵Department of Internal Medicine, Center of Medical Science, Federal University of Paraíba - UFPB, João Pessoa, PB-Brazil

⁶Department of Clinical and Social Odontology, Centre of Health Sciences, Federal University of Paraíba - UFPB, João Pessoa, PB-Brazil

*Corresponding Author:

Dra. Sabrina Garcia de Aquino

Federal University of Paraíba

Centre of Health Sciences

Department of Clinical and Social Odontology

Cidade Universitária – Campus I, 58051-900

João Pessoa-PB/ Brazil

Phone: +55 83 3216-7243

sabrinaquino@yahoo.com.br

Running title: Polymorphism and DNA methylation in periodontitis and systemic lupus erythematosus.

ABSTRACT

Aim: This study investigated the contribution of the methylation-related gene polymorphisms *DNMT3B* (rs2424913) and *MTHFR* (rs1801133) to Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Periodontitis. **Methods:** 196 individuals of both sexes ranging from 24 to 60 years were allocated into four groups based on their systemic and periodontal status, namely: Healthy control (n=60), Periodontitis (n=51), SLE (n=47) and SLE + Periodontitis (n=38). Individuals with SLE were stratified according to disease activity (SLEDAI) in mild or severe. Polymorphism analysis was performed through PCR-RFLP with genomic DNA from mouthwash. Data were analyzed by Fisher's Exact, Chi-square test and regression models. **Results:** Periodontitis was similar in subjects with periodontitis and with SLE + periodontitis. SLE patients with periodontitis presented a longer SLE diagnoses in comparison to SLE only (P=0.001). For *DNMT3B* polymorphism, Periodontitis, SLE and Mild SLE + Periodontitis groups showed a higher frequency of T allele and TT genotypes compared to healthy controls (P<0.05). Regression analyses showed the TT genotype increases the odds of periodontitis (6-fold) or SLE (11- to 12-fold). **Conclusion:** SLE patients with periodontitis had a longer length of SLE. The *DNMT3B* (rs2424913) polymorphism was associated with periodontitis, and SLE alone or combined with periodontitis. **Clinical Relevance:** This study contributes to understanding the molecular mechanisms involved in periodontitis and SLE susceptibility.

Keywords: systemic lupus erythematosus, periodontitis, DNA methylation, polymorphism, inflammation, genetic, LES

INTRODUCTION

The host immune response is the key point for the onset or progression of chronic immune inflammatory disorders, including periodontal disease, rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus SLE [1, 2]. SLE is a systemic autoimmune disease characterized by connective tissue destruction in multiple organs under abnormal T cell activity and high autoantibody levels [3, 4]. While the exact etiology remains unclear, chronic infections have been identified as triggers for SLE development in genetically predisposed subjects [5]. In this context, there is strong evidence that periodontitis and oral dysbiosis are associated with autoimmune inflammatory diseases [6]. Periodontitis is a chronic inflammatory polymicrobial infection in which attachment loss and bone destruction around teeth results from an imbalance in the host immune response against a dysbiotic dental biofilm in susceptible individuals. Notably, environmental, epigenetic and genetic factors dictate disease susceptibility as the main modulators of the host response, which drives most of the tissue damage in periodontitis [7].

The association between periodontitis and SLE has been primarily based on the similar pathophysiology [8]. Increasing epidemiologic evidence has shown both a high prevalence and an increased risk of periodontitis in SLE patients [6, 9]. Conversely, there are controversial data concerning periodontal status in SLE patients, and some studies reported a better [10], a similar [11–13] and a more severe form of Periodontitis in SLE patients [14]. Moreover, interventional studies have demonstrated the beneficial effect of periodontal therapy in reducing SLE disease activity [15] and ameliorating the response to treatment. Indeed, there are few mechanistic studies to further elucidate the underlying mechanisms of Periodontitis and SLE association, which are still largely unknown. Recently, a Mendelian randomization study proposed a causal association between periodontitis, RA and SLE [16].

In light of the common multifactorial signature of Periodontitis and SLE, including the influence of both environmental and genetic factors on susceptibility to diseases, there is growing evidence of epigenetic changes in PD and SLE pathogenesis [17–21]. This is because environmental factors may induce epigenome changes in DNA and histones, including DNA methylation in CpG dinucleotide islands (mostly in gene promoter regions), and modulate gene expression and host response [17, 18].

A systemic hyperinflammatory scenario has been considered the major underlying link between PD and other chronic inflammatory disorders [8]. Specifically, in SLE, both

increased cytokine and autoantibodies released by abnormal T and B cells are related to the hypomethylation of the DNA regulatory region [22].

Genetic polymorphisms in genes encoding enzymes from folate/homocysteine pathways may influence the DNA methylation profile, including the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) and DNA methyltransferase (*DNMT*) genes [23, 24]. The enzyme encoded by *MTHFR* originates during folate metabolism the S-adenosyl methionine (SAM) radical (a methyl donor), whereas *DNMT* uses SAM as a substrate in the DNA methylation process [25]. In particular, C677T *MTHFR* (rs1801133) polymorphism is related to decreased enzyme activity of methylenetetrahydrofolate reductase and -149C→T *DNMT3B* (rs2424913) polymorphism is related to increased expression of *DNMT3B*. Changes in the activity or concentration of these enzymes can influence the DNA methylation profile, which in turn can lead to changes in gene expression [26].

Studies have shown the involvement of *MTHFR* or *DNMT3B* polymorphisms in inflammatory diseases [27, 28]. Recently, our group revealed the association of the 149C→T *DNMT3B* (rs2424913) polymorphism with periodontitis [19], but not for C677T *MTHFR* (rs1801133). In the present study, our aim was to study the association of these polymorphisms in individuals with systemic lupus erythematosus, as well as in individuals with systemic erythematosus and periodontitis.

MATERIAL AND METHODS

Subjects and research ethics

This cross-sectional study comprised a study population of 196 individuals, of both sexes, aged from 18 years. Participants were recruited from February 2019 to October 2019. Systemically healthy individuals (n = 111) were selected from the staff team and patients at the Dental Periodontics Clinic, Department of Clinical and Social Dentistry at UFPB, João Pessoa, Brazil. Subjects with SLE (n = 85) were recruited at the Center of Rheumatology at the Lauro Wanderley University Hospital, UFPB. This study followed the Helsinki Declaration and was approved by the Institutional Research and Ethics Committee at the Federal University of Paraiba (UFPB) (CAAE: 3.100.993). All subjects signed an informed consent form to authorize their participation in the study.

SLE and periodontal assessment

SLE status- SLE activity was classified by a rheumatologist specialist in mild (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index: SLEDAI $\geq 2 \leq 7$) or severe (SLEDAI > 7) stages according to the guidelines of the American Academy of Rheumatology [29].

Periodontal status- Oral examination was performed to evaluate oral health conditions and to determine periodontal status. Periodontal diagnosis was assessed by a single examiner previously calibrated and included plaque index (PI), probing depth (PD), bleeding on probing (BOP), clinical attachment level (CAL) at six sites per tooth, as well as the number of missing teeth. Periodontal assessment was based on the current Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions [30]. The control group (periodontal health) consisted of CAL and PD ≤ 3 mm (no clinical attachment loss), BOP in less than 10% of sites and no radiographic bone loss. The following criteria for the diagnosis of periodontitis were considered: at least 15 remaining natural teeth; clinical attachment loss and PD ≥ 5 mm detected in three or more nonadjacent interproximal sites; and clinical attachment loss ≥ 3 mm in the buccal or lingual/palate sites of at least 2 teeth not related to factors other than periodontal disease [30]. Considering that current periodontal inflammatory status does not influence the polymorphism analysis, SLE patients with stable periodontitis in a reduced periodontium according to the current Classification of Periodontitis [30] were included in the SLE + Periodontitis group.

According to systemic condition (systemic health or with SLE diagnosis) and periodontal status (absence or presence of periodontitis), a convenience sample was categorized into four groups as follows: healthy control (n = 60), Periodontitis (n = 51), SLE (n = 47) and SLE + Periodontitis (individuals with SLE also diagnosed with periodontitis (n = 38). Demographic and medical history of participants were assessed through a questioner or medical chart patient analysis. The exclusion criteria consisted of a history of HIV, hepatitis, diabetes, pregnancy, orthodontic treatment and smoking habits.

Sample collection

Genomic DNA samples were obtained from buccal mucosa cells through a mouthwash. Briefly, the cells were harvested through a one-minute mouthwash with 3% dextrose solution (6 mL) followed by TNE addition (3 mL). The homogenates were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes, and pelleted cell samples were stored in lysis solution at -20 °C until DNA extraction [31].

DNA extraction and genetic polymorphism analysis

Genomic DNA was purified using 8 M ammonium acetate as described previously [19]. The quantity and purity of DNA were determined on a Nanodrop spectrophotometer. The analysis of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) C677T *MTHFR* (rs1801133) and -149C→T *DNMT3B* (rs2424913) was performed using the PCR-RFLP technique (polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism), which consisted of DNA amplification by PCR and digestion of DNA fragments by a restriction enzyme. Restriction enzyme activity determined the presence or absence of the SNP. Briefly, PCR was performed using 100 ng of total DNA in a 15 µL final volume reaction containing 7.5 µL of GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega), 4.5 µL of DNA and nuclease-free water in the presence of 1 µL of each primer (10 µM). Primer sequences, as well as both PCR and enzymatic digestion conditions, were used as previously described [19]. PCR products were resolved by electrophoresis on 6% (w/v) polyacrylamide gels containing GelRed® (Biotium) or silver nitrate. The 677 CC/CT/TT and -149 CC/CT/TT genotypes were identified through their band pattern [19].

Statistical analysis

All data were tabulated into Excel® spreadsheets and analyzed in SPSS 25.0 at a significance level of $P < 0.05$. Demographic data were analyzed descriptively. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated for each polymorphism using the chi-square test. Fisher's exact test and chi-square test with or without Yates correction were used to analyze possible associations among allele and genotypic frequencies, SLE and periodontitis. Binary logistic regression models (univariate and multivariate) were used to determine the most significant associations. Variables with p -values ≤ 0.10 were considered for entry into the model, and p -values ≤ 0.05 were considered for permanence in the multiple model. Model adjustment was performed using the backward method. Categorical variables with a p value ≤ 0.10 on univariate analysis were recategorized, and the nonsignificant category for the outcome was inserted next to the reference category. Five models were adjusted for regression analysis, considering the following outcomes: (1): Periodontitis (1) x Control (0); (2): SLE (1) x Control (0); (3): SLE (1) x Periodontitis (0); (4): SLE + Periodontitis (1) x Periodontitis (0); and (5): SLE (1) x SLE + Periodontitis (0). For the outcome "SLE + Periodontitis (1) x Control (0)", none of the variables was significant at the level of 0.10 in the univariate

analysis, and therefore, a predictive model could not be adjusted. All analyses were performed using Software R (version 3.6.1).

RESULTS

The demographic data and clinical and periodontal status of the study population are shown in Table 1. The subjects in the control, Periodontitis, SLE and SLE + Periodontitis groups presented a similar mean age with no significant differences: Control: (38.48 ± 8.16) years, Periodontitis: (48.96 ± 11.30 years), SLE: (33.17 ± 8.95) years, SLE + Periodontitis: (38.87 ± 10.03), $P = 0.110$).

Patients with SLE without periodontitis presented a shorter time of SLE diagnosis (5.21 ± 5.17) years, whereas patients from the SLE + Periodontitis group had a longer length of SLE diagnosis (10.34 ± 7.81 years, $P = 0.001$). The number of mild cases ($n = 20$; 42.6%) was lower than severe cases ($n = 27$; 57.40%) in the SLE group ($P < 0.001$). For the SLE + Periodontitis group, 63.20% ($n = 24$) of subjects presented mild SLE, and 36.80% ($n = 14$) of individuals presented severe SLE ($P < 0.001$). There was no difference in the profile of medication used by SLE subjects and patients with SLE and periodontitis.

Periodontal status was similar in both the periodontitis and SLE + Periodontitis groups, and no significant differences were observed ($P = 0.877$); subjects from Periodontitis group were diagnosed as Stage II ($n = 25$; 49.00%) and Stage III/IV ($n = 26$; 51.00%); individuals with SLE + Periodontitis were classified as Stage II ($n = 18$; 47.4%) and Stage III/IV ($n = 20$; 52.6%). The number of missing teeth was similar in all case groups: periodontitis (7.84 ± 5.84), SLE (8.04 ± 5.15) and SLE + Periodontitis (9.16 ± 5.54) ($P = 0.332$).

Genetic polymorphism analysis

The allelic and genotypic distributions of the study population are presented in Table 2 and 3, respectively. Genotypic frequencies are in accordance with HWE for both studied polymorphisms: *MTHFR* (rs1801133): Control ($P = 0.57$), Periodontitis ($P = 0.13$), SLE ($P = 0.25$) and SLE + Periodontitis ($P = 0.27$), and *DNMT3B* (rs2424913): Control ($P = 0.54$), Periodontitis ($P = 0.89$), SLE ($P = 0.72$) and SLE + Periodontitis ($P = 0.80$).

For *MTHFR*, the C allele and genotypes CC and CT were the most common distributions in all groups, and no significant differences were observed ($p > 0.05$).

For the *DNMT3B* polymorphism, the frequency of the T allele and the TT genotype

respectively was higher in the periodontitis (52.9%; 27.5%) and SLE (60.5%; 38.3%) groups compared to the control group (31.7%; 8.3%), even when the groups with mild (67.5%; 40%) and severe (55.5%; 37%) form of SLE were compared separately with the control group ($p < 0.05$). When the comparison was made between the control (31.7%; 8.3%) and the SLE + Periodontitis (46%; 21.1%) group, the difference was no longer observed ($p > 0.05$). However, when stratifying the group according to severity of SLE, it is observed that the higher frequency of the T allele and the TT genotype is detected in the SLE group with mild form (50%; 29.2%) in comparison to control group ($p < 0.05$).

Binary logistic regression analysis

Binary logistic regression (adjusted and nonadjusted) for different outcomes are presented in Table 4. As expected, SLE subjects without periodontitis presented as a protective factor in the number of bleeding sites (OR: 0.95 [0.92-0.98]) and (OR: 0.95 [0.92-0.98]) in comparison to the SLE + Periodontitis group. Intriguingly, patients with SLE and Periodontitis presented a protective factor regarding the number of sites with periodontal pockets (OR: 0.96 [0.93-0.98]) and (OR: 0.95 [0.92-0.99]).

Binary logistic regression performed for the whole sample showed that SLE not increased the odds of periodontitis ($P = 0.863$). However, regarding genotypic profile, the TT genotype increased the odds of SLE development from 12 to 11 times in univariate and multivariate analyses, respectively. Individuals with the TT genotype are approximately six times the risk of periodontitis development.

DISCUSSION

Considering the marked role of genetic, epigenetic and environmental factors on the onset of both SLE and periodontitis, the present study investigated for the first time the contribution of methylation-related gene polymorphisms to the clinical association between SLE and periodontitis. Here, the polymorphism -149C→T *DNMT3B* (rs2424913) was found to be linked with both diseases. Indeed, demographic and clinical findings suggest that periodontitis develops similarly in SLE patients and that its establishment may be associated with the length of SLE diagnosis.

Indeed, we observed a lower prevalence of periodontitis in SLE patients (25.9%) in comparison to findings from other studies (42.59% to 88.53%) [14, 32, 33]. This can also be attributed to variations and a lack of clarity of periodontal case definitions used to diagnose

periodontitis [6, 12]. Moreover, while other studies in this field considered a minimum of 8 remaining teeth in the inclusion criteria, we considered at least 15 remaining teeth; this criterion also may have contributed to underestimating the presence of periodontitis and to reducing SLE + Periodontitis cases in our study [12, 34, 35]. Tooth loss is an important parameter to be considered that has been incorporated into the current classification of periodontal disease that was used in the present study [30, 36]. In our data, the mean tooth loss was similar among systemically healthy and SLE subjects with periodontitis. To date, there is an emerging discussion regarding the inclusion of patients with extensive tooth loss and stable remaining teeth (with no current active periodontal disease) in periodontal medicine studies [36]. Notably, we observed SLE patients with this clinical profile (tooth loss and signs of previous history of periodontitis), which were included in the SLE + Periodontitis group. However, a longitudinal follow-up is important to accurately distinguish the causes of high tooth loss due to periodontal or other dental problems, including caries, in SLE patients [37].

The study of genetic polymorphisms is extremely important in gene mapping and in the search for genes involved in common disorders, with important applicability for personalized medicine [38]. In particular, *MTHFR* or *DNMT3B* polymorphisms have been associated with inflammatory diseases [27, 28].

In the current study, we observed that individuals with periodontitis, SLE and mild SLE + Periodontitis presented a higher frequency of the T allele and the TT genotype for *DNMT3B*. The data in relation to periodontitis confirm our results previously found [19] and for the first time we show an association between rs2424913 polymorphism and SLE and SLE concomitant with periodontitis. The TT genotype (no CT genotype) has been associated with an upregulation of *DNMT3B* and increased hypermethylation status, which may silence important protective genes related to periodontitis and SLE [24]. In fact, there is growing evidence of DNA methylation changes in periodontitis and SLE [19, 20, 22].

Intriguingly, the frequency of the T allele and TT genotype observed in Mild SLE + Periodontitis group was not observed in the Severe SLE + Periodontitis group. We may hypothesize that this can be explained by the smaller sample size in the Severe SLE + Periodontitis group or possibly by a different biological mechanism with the influence of other polymorphisms in patients with concomitant Severe form of SLE and periodontitis. Recently, a review emphasized that SLE is the most heterogeneous disease treated by physicians, making diagnosis and treatment a challenge [39]. Other authors have previously

argued that SLE is not just one disease, but many, based on different clinical presentations and their degrees of severity [40]. Thus, based on the data from the present study, we can speculate that the heterogeneity of the disease may also be related to different metabolic pathways, which in turn are determined by different polymorphisms. In fact, authors state that genetics is not only involved in susceptibility to SLE, but is also involved in the clinical course of the disease. In addition, the literature shows that SLE may have a multifactorial etiology (environmental factors associated with genetic polymorphisms) or monogenic etiology (mutations) [41, 42].

While data on polymorphisms related to SLE and periodontitis are relatively vast [41, 43], to the best to our knowledge, few studies have evaluated genetic polymorphisms in a population with SLE + Periodontitis. Kobayashi et al (2003) [14] showed an association of the *FcgammaR* polymorphism with SLE + Periodontitis in a Japanese population. In a Mendelian randomization study, the *IGF2R* polymorphism was associated with periodontitis and SLE in an European population [16]. In both studies, the degree of SLE severity was not taken into account, unlike the present study.

In contrast to the findings for *DNMT3B* (rs2424913), the C677T *MTHFR* polymorphism was not associated with periodontitis and/or SLE, as the C allele and the CC and CT genotypes were the most frequent genotypes in the entire population. The data in relation to periodontitis confirm our results previously found [19] and in relation to SLE are consistent with Salimi et al., 2017 [44] that found no association too.

Regarding disease activity, a similar periodontal condition was observed between the Periodontitis and SLE + Periodontitis groups, as verified in other investigations [12, 13, 34, 35], contrasting to a worse periodontal condition in SLE patients found by others [14]. Moreover, SLE patients without periodontitis presented a protective factor in the number of bleeding sites in comparison to SLE patients with periodontitis, in agreement with a previous study [45]. Intriguingly, patients with SLE + Periodontitis presented a protective factor regarding the number of sites with periodontal pockets. These findings may be related to the chronic use of medications by SLE patients, which may affect the infectious and inflammatory processes. For instance, increased doses of immunosuppressive agents in nonresponding patients may possibly contribute to the control of periodontal inflammation [46, 47]. In contrast, prolonged use of corticosteroids at high doses has been associated with periodontal destruction in patients with SLE [12]. Importantly, periodontitis was most frequent in severe activity SLE patients with longer length of SLE diagnosis ($P = 0.001$) and,

consequentially, under prolonged treatment. This finding highlights the importance of an early periodontal diagnosis to prevent the onset and progression of periodontal disease in patients with SLE.

Notably, current research has shown the influence of common drugs used in SLE treatment (glucocorticoids and hydroxychloroquine) on the epigenetic profile of diverse immune cells [48]. As an example, MTX treatment increased global DNA methylation in monocytes, B and T cells from patients with RA, with no changes in *DNMT3B* expression or other methylation-specific enzymes, and this effect needs to be further elucidated [49]. Thus, we can speculate that the prolonged use of immunosuppressive drugs may influence the methylation profile of patients with SLE and periodontitis and, finally, the clinical outcomes. This association between the DNA methylation profile and specific clinical manifestations has been verified in SLE [50]. Indeed, the methylation status of some genes has been proposed as a biomarker for both diagnosis and monitoring disease activity [18]. The present study focused on methylation-related gene polymorphisms associated with inflammatory diseases that had never been studied before in diagnosed SLE patients with periodontitis. However, many target genes still need to be analyzed.

The limitation of this study consists of a low sample size due to the well-defined inclusion criteria as well as a narrow sample collection period. So, this data should be further explored in larger populations with different ethnic backgrounds which could provide definitive conclusions.

Taken together, this study demonstrates the association of the polymorphism -149C→T *DNMT3B* (rs2424913) with the occurrence of SLE and concomitant SLE + periodontitis in individuals with the mild form of SLE. Moreover, SLE patients with periodontitis had a longer length of SLE.

Acknowledgments

The authors are thankful to study participants, the director of the Periodontics Clinic (UFPB), and to the Center of Rheumatology at Lauro Wanderley University Hospital (UFPB) for consenting sample collection.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship and/or publication of this article.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors

REFERENCES

- [1] Bunte K, Beikler T. Th17 cells and the IL-23/IL-17 axis in the pathogenesis of periodontitis and immune-mediated inflammatory diseases. *Int J Mol Sci*; 20. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3390/ijms20143394.
- [2] Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 1997; 2: 12–26.
- [3] Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2011; 365: 2110–2121.
- [4] La Paglia GMC, Leone MC, Lepri G, et al. One year in review 2017: Systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2017; 35: 551–561.
- [5] Qiu CC, Caricchio R, Gallucci S. Triggers of Autoimmunity: The Role of Bacterial Infections in the Extracellular Exposure of Lupus Nuclear Autoantigens. *Front Immunol* 2019; 10: 1–15.
- [6] Rutter-Locher Z, Smith TO, Giles I, et al. Association between systemic lupus erythematosus and periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Front Immunol*; 8. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01295.
- [7] Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000 2015; 69: 7–17.
- [8] Sete MRC, Figueredo CM da S, Sztajn bok F. Periodontitis and systemic lupus erythematosus. *Rev Bras Reumatol* 2016; 56: 165–170.
- [9] Graves DT, Corrêa JD, Silva TA. The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. *J Dent Res* 2018; 98: 148–156.
- [10] Mutlu S, Richards A, Maddison P, et al. Gingival and periodontal health in systemic lupus erythematosus. *Community Dent Oral Epidemiol* 1993; 21: 158–161.
- [11] Calderaro DC, Ferreira GA, Corrêa JD, et al. Is chronic periodontitis premature in systemic lupus erythematosus patients? *Clin Rheumatol* 2017; 36: 713–718.
- [12] Mendonça SMS, Corrêa JD, Souza AF, et al. Immunological signatures in saliva of systemic lupus erythematosus patients: influence of periodontal condition. *Clin Exp Rheumatol* 2019; 37: 208–214.
- [13] Rezaei M, Bayani M, Tasorian B, et al. The comparison of visfatin levels of gingival crevicular fluid in systemic lupus erythematosus and chronic periodontitis patients with healthy subjects. *Clin Rheumatol* 2019; 38: 3139–3143.
- [14] Kobayashi T, Ito S, Yamamoto K, et al. Risk of Periodontitis in Systemic Lupus Erythematosus Is Associated with Fcγ Receptor Polymorphisms. *J Periodontol* 2003; 74: 378–384.
- [15] Fabbri C, Fuller R, Bonfá E, et al. Periodontitis treatment improves systemic lupus erythematosus response to immunosuppressive therapy. *Clin Rheumatol* 2014; 33: 505–509.
- [16] Bae SC, Lee YH. Causal association between periodontitis and risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a Mendelian randomization. *Z Rheumatol*. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1007/s00393-019-00742-w.
- [17] Long H, Yin H, Wang L, et al. The critical role of epigenetics in systemic lupus

- erythematosus and autoimmunity. *J Autoimmun* 2016; 74: 118–138.
- [18] Hurtado C, Acevedo Sáenz LY, Vásquez Trespalacios EM, et al. DNA methylation changes on immune cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmunity* 2020; 0: 1–8.
 - [19] Coêlho MC, Queiroz IC, Viana Filho JMC, et al. miR-9-1 gene methylation and DNMT3B (rs2424913) polymorphism may contribute to periodontitis. *J Appl Oral Sci* 2020; 28: 1–11.
 - [20] Almiñana-Pastor PJ, Boronat-Catalá M, Micó-Martínez P, et al. Epigenetics and periodontics: A systematic review. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal* 2019; 24: e659–e672.
 - [21] Ghodke-Puranik Y, Niewold TB. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun* 2015; 64: 125–136.
 - [22] Chen SH, Lv QL, Hu L, et al. DNA methylation alterations in the pathogenesis of lupus. *Clin Exp Immunol* 2017; 187: 185–192.
 - [23] Nash AJ, Mandaviya PR, Dib MJ, et al. Interaction between plasma homocysteine and the MTHFR c.677C > T polymorphism is associated with site-specific changes in DNA methylation in humans. *FASEB J* 2019; 33: 833–843.
 - [24] Naghibalhossaini F, Mokarram P, Khalilia E, et al. DNMT3b -149C/T promoter variants and methylation of colorectal cancer-associated genes. *Cancer Biomarkers* 2015; 15: 227–233.
 - [25] Weber M, Hellmann I, Stadler MB, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 2007; 39: 457–466.
 - [26] Fang JY, Xiao SD. Folic acid, polymorphism of methyl-group metabolism genes, and DNA methylation in relation to GI carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2003; 38: 821–829.
 - [27] Dedoussis GVZ, Panagiotakos DB, Pitsavos C, et al. An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 2005; 100: 409–414.
 - [28] Cai TT, Zhang J, Wang X, et al. Gene–gene and gene–sex epistatic interactions of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in autoimmune thyroid disease. *Endocr J* 2016; 63: 643–653.
 - [29] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum*; 40.
 - [30] Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol* 2018; 45: 1–8.
 - [31] Trevillato, P. C.; Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol* 2000; 18: 6–9.
 - [32] Gofur NRP, Nurdiana N, Kalim H, et al. Periodontitis is associated with disease severity and anti-double stranded DNA antibody and interferon-gamma levels in patients with systemic lupus erythematosus. *J Taibah Univ Med Sci* 2019; 14: 560–565.
 - [33] Zhang Q, Zhang X, Feng G, et al. Periodontal disease in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2017; 37: 1373–1379.
 - [34] Calderaro DC, Ferreira GA, de Mendonça SMS, et al. Is there an association between systemic lupus erythematosus and periodontal disease? *Rev Bras Reumatol* 2016; 56: 280–284.
 - [35] Corrêa JD, Calderaro DC, Ferreira GA, et al. Subgingival microbiota dysbiosis in systemic lupus erythematosus: Association with periodontal status. *Microbiome* 2017; 5: 1–13.

- [36] Beck JD, Papapanou PN, Philips KH, et al. Periodontal Medicine: 100 Years of Progress. *J Dent Res* 2019; 98: 1053–1062.
- [37] Benli M, Batool F, Stutz C, et al. Orofacial manifestations and dental management of systemic lupus erythematosus: A review. *Oral Dis*; 33. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1111/odi.13271.
- [38] Horton RH, Lucassen AM. Recent developments in genetic / genomic medicine. 2019; 0: 697–708.
- [39] Dörner T, Furie R. Novel paradigms in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2019; 393: 2344–2358.
- [40] Rivas-Larrauri F, Yamazaki-Nakashimada MA. Lupus eritematoso sistémico: ¿es una sola enfermedad? *Reumatol Clin* 2016; 12: 274–281.
- [41] Javinani A, Ashraf-Ganjouei A, Aslani S, et al. Exploring the etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: a genetic perspective. *Immunogenetics* 2019; 71: 283–297.
- [42] Omarjee O, Picard C, Frachette C, et al. Monogenic lupus: Dissecting heterogeneity. *Autoimmun Rev*; 18. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1016/j.autrev.2019.102361.
- [43] Heidari Z, Moudi B, Mahmoudzadeh-Sagheb H. Immunomodulatory factors gene polymorphisms in chronic periodontitis: An overview. *BMC Oral Health* 2019; 19: 1–15.
- [44] Salimi S, Keshavarzi F, Mohammadpour-Gharehbagh A, et al. Polymorphisms of the folate metabolizing enzymes: Association with SLE susceptibility and in silico analysis. *Gene* 2017; 637: 161–172.
- [45] Pessoa L, Aleti G, Choudhury S, et al. Host-Microbial Interactions in Systemic Lupus Erythematosus and Periodontitis. *Front Immunol*; 10. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02602.
- [46] Al-Mutairi KD, Al-Zahrani MS, Bahlas SM, et al. Periodontal findings in systemic lupus erythematosus patients and healthy controls. *Saudi Med J* 2015; 36: 463–468.
- [47] Fanouriakis A, Kostopoulou M, Alunno A, et al. 2019 Update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: 736–745.
- [48] Guo Y, Sawalha AH, Lu Q. Epigenetics in the treatment of systemic lupus erythematosus: Potential clinical application. *Clin Immunol* 2014; 155: 79–90.
- [49] de Andres MC, Perez-Pampin E, Calaza M, et al. Assessment of global DNA methylation in peripheral blood cell subpopulations of early rheumatoid arthritis before and after methotrexate. *Arthritis Res Ther* 2015; 17: 1–9.
- [50] Zhao M, Liu S, Luo S, et al. DNA methylation and mRNA and microRNA expression of SLE CD4⁺ T cells correlate with disease phenotype. *J Autoimmun* 2014; 54: 127–136.

Tables

Table 1. Demographic data and clinical and periodontal status of the study population including the mean age, the mean time of SLE diagnosis (in years), disease severity (mild or severe), sex distribution, current use of drugs as well as periodontal status and the number of missing teeth are described as the mean $\pm$ SD or total number (n) and percentage (%).

Variable	Control (n = 60)	Periodontitis (n = 51)	SLE (n = 47)	SLE + Periodontitis (n = 38)	p value
Age (mean SD)	38.48 (±8.16)	48.96 (±11.30)	33.17 (±8.95)	38.87 (±10.03)	0.110 ^I
Sex n (%)					
Female	47 (78.30%)	29 (56.90%)	43 (91.50%)	36 (94.70%)	<0.001 ^{II}
Male	13 (21.70%)	22 (43.10%)	4 (8.50%)	2 (5.30%)	
SLE duration (years) (mean SD)	-	-	5.21 (5.17)	10.34 (7.81)	0.001 ^{III}
SLE activity					
Mild SLE n (%)	-	-	20 (42.60%)	24 (63.20%)	<0.001 ^{IV}
Severe SLE n(%)	-	-	27 (57.40%)	14 (36.80%)	
Medication use					
Use of corticosteroid n (%)	-	-	18 (38.30%)	16 (42.10%)	0.086 ^{IV}
Use of immunosuppressive n (%)	-	-	30 (63.80%)	17 (44.70%)	0.825 ^{IV}
Use of hydroxychloroquine n (%)	-	-	42 (89.40%)	34 (89.50%)	0.987 ^{IV}
Periodontal status					
Stage II n (%)		25 (49.00%)	-	18 (47.40%)	0.877 ^{IV}
Stage III or IV n (%)		26 (51.00%)	-	20 (52.60%)	
Number of missing teeth (mean SD)	-	7.84 (5.84)	8.04 (5.15)	9.16 (4.54)	0.332 ^I

^I One-way ANOVA (Tukey post-hoc test); ^{II} Chi-Square test with Yates Correction; ^{III} Student T-test; ^{IV} Chi-Square test. Significance level=5%.

Table 2. Comparative analysis of allele frequencies of the studied polymorphisms (*MTHFR* and *DNMT3B*) among the control, periodontitis, SLE and SLE + Periodontitis groups. Chi-square test and chi-square test with Yates correction. Significance level = 5%.

Gene SNP	<i>MTHFR</i>		<i>DNMT3B</i>	
	C677T(rs1801133)		C46359T (rs2424913)	
Allelic frequency	C	T	C	T
Control¹ n=60	85 (70.80%)	35 (29.20%)	82 (68.30%)	38 (31.70%)
Perio² n=51	69 (67.60%)	33 (32.40%)	48 (47.06%)	54 (52.94%)
p value^{1,2}	0.181		0.011	
SLE³ n=47	70 (74.50%)	24 (25.50%)	37 (39.36%)	57 (60.64%)
p value^{1,3}	0.565		<0.001	
Mild SLE⁴ n=20	28 (70.00%)	12 (30.00%)	13 (32.50%)	27 (67.50%)
p value^{1,4}	0.897		0.002	
Severe SLE⁵ n=27	42 (77.78%)	12 (22.22%)	24 (44.44%)	30 (55.56%)
p value^{1,5}	0.360		0.002	
SLE + Perio⁶ n=38	51 (67.10%)	25 (32.90%)	41 (53.95%)	35 (46.05%)
p value^{1,6}	0.529		0.138	
Mild SLE + Perio⁷ n = 24	32 (66.67%)	16 (33.33%)	24 (50.00%)	24 (50.00%)
p value^{1,7}	0.810		0.020	
Severe SLE + Perio⁸ n= 14	19 (67.86%)	09 (32.14%)	17 (60.71%)	11 (39.29%)
p value^{1,8}	0.773		0.370	

Table 3. Comparative analysis of genotype frequencies of the studied polymorphisms (*MTHFR* and *DNMT3B*) among the control, periodontitis, SLE and SLE + Periodontitis groups. Chi-square test and chi-square test with Yates correction. Significance level = 5%.

Gene SNP	<i>MTHFR</i> C677T (rs1801133)			<i>DNMT3B</i> C46359T (rs2424913)		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Genotype frequencies						
Control¹ n=60	31 (51.70%)	23 (38.30%)	6 (10.00%)	27 (45.00%)	28 (46.70%)	5 (8.30%)
Perio² n=51	21 (41.20%)	27 (52.90%)	3 (5.90%)	11 (21.60%)	26 (51.00%)	14 (27.50%)
p value^{1,2}	0.275			0.005		
SLE³ n=47	27 (57.40%)	16 (34.00%)	4 (8.50%)	8 (17.00%)	21 (44.70%)	18 (38.30%)
p value^{1,3}	0.842			<0.001		
Mild SLE⁴ n=20	10 (50.00%)	8 (40.00%)	2 (10.00%)	1 (5.00%)	11 (55.00%)	8 (40.00%)
p value^{1,4}	0.991			<0.001		
Severe SLE⁵ n=27	17 (63.00%)	8 (29.60%)	2 (7.40%)	7 (26.00%)	10 (37.00%)	10 (37.00%)
p value^{1,5}	0.618			0.003		
SLE + Perio⁶ n=38	19 (50.00%)	13 (34.20%)	6 (15.80%)	11 (28.90%)	19 (50.00%)	8 (21.10%)
p value^{1,6}	0.735			0,105		
Mild SLE + Perio⁷ n = 24	11 (45.80%)	10 (41.70%)	3 (12.50%)	7 (29.20%)	10 (41.70%)	7 (29.20%)
p value^{1,7}	0.876			0.042		
Severe SLE + Perio⁸ n =14	8 (57.20%)	3 (21.40%)	3 (21.40%)	4 (28.60%)	9 (64.30%)	1 (7.10%)
p value^{1,8}	0.378			0.620		

Table 4. Results for binary logistic regression (nonadjusted and adjusted) for different outcomes, considering the sex, age, DMNT3B, bleeding sites and sites with periodontal pocket.

Outcomes	Variable	Categories	Non adjusted			Adjusted		
			p value	OR	IC 95%	P value	OR	IC 95%
Periodontitis x Control	Sex	Female	-	1.00	-	-	-	-
		Male	0.017	2.74	1.20-6.27	-	-	-
	Age		<0.001	1.11	1.06-1.16	<0.001	1.11	1.05-1.16
	DMNT3B	CC	-	1.00	-	-	1.00	-
		CT	0.067	2.27	0.94-5.50	0.363	1.60	0.58-4.43
		TT	0.002	6.87	1.20-23.71	0.032	4.53	1.13-18.05
SLE x Control	Sex	Female	-	1.00	-	-	-	-
		Male	0.074	0.33	0.10-1.11	-	-	-
	Age		0.003	0.92	0.88-0.97	0.008	0.92	0.87-0.98
	DMNT3B	CC	-	1.00	-	-	1.00	-
		CT	0.061	2.53	0.95-6.68	0.094	2.37	0.86-6.53
		TT	<0.001	12.15	3.42-43.11	<0.001	11.57	3.12-42.84
SLE x Periodontitis	Sex	Female	-	1.00	-	-	1.00	-
		Male	<0.001	0.12	0.03-0.39	0.023	0.11	0.01-0.73
	Age		<0.001	0.85	0.79-0.91	0.003	0.82	0.72-0.93
	Bleeding sites		<0.001	0.92	0.89-0.95	<0.001	0.91	0.87-0.95
SLE with Periodontitis x Periodontitis	Sex	Female	-	1.00	-	-	-	-
		Male	0.001	0.07	0.01-0.33	-	-	-
	Age		<0.001	0.91	0.87-0.96	0.004	0.90	0.83-0.96
	Sites with periodontal pocket		0.047	0.96	0.93-0.98	0.024	0.95	0.92-0.99
SLE x SLE with Periodontitis	Bleeding sites		0.002	0.95	0.92-0.98	0.002	0.95	0.92-0.98

* Some variables were not evaluated for all groups, and for this reason, only those that were evaluated in the compared groups are shown for each outcome.

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este é o primeiro estudo que analisa os polimorfismos C677T *MTHFR* e *DNMT3B* -149C→T em pacientes com LES e periodontite, trazendo importantes contribuições para a literatura mostrando que o polimorfismo *DNMT3B* -149C→T pode estar associado a uma maior suscetibilidade ao LES ou à periodontite.

Os resultados encontrados contribuem para o esclarecimento dos mecanismos moleculares que podem estar envolvidos no desenvolvimento do LES e da periodontite. Achados desta natureza são extremamente importantes no mapeamento gênico e na procura de genes relacionados a distúrbios comuns, possuindo importante aplicabilidade para a medicina personalizada, a qual pode permitir a prevenção, o diagnóstico precoce de doenças e o tratamento direcionado para cada paciente.

Como limitações, foram encontradas dificuldades em atingir o tamanho amostral ideal para todos os grupos devido ao tempo de coleta de dados limitado e os critérios de inclusão bem definidos e restritos. Esta dificuldade foi maior no recrutamento de pacientes com LES e periodontite, considerando o grande número de pacientes com extensiva perda dental e uso de próteses que não puderam se enquadrar nos critérios de inclusão por não apresentarem um mínimo de 15 dentes remanescentes. Muitos destes pacientes não avaliados podem ter estas perdas dentais decorrentes da periodontite e serem atualmente portadores de uma provável sequela da doença periodontal (poucos dentes remanescentes em um periodonto reduzido). Entretanto, não temos como confirmar com precisão a causa de cada perda dental que pode ter ocorrido devido à periodontite ou por outros problemas dentais, incluindo a cárie. Acreditamos que em futuros estudos a inclusão destes pacientes na investigação é essencial para o melhor entendimento desta associação já que os pacientes portadores de LES são indivíduos que apresentam uma grande perda de dentes provavelmente pela instalação mais precoce da periodontite como observado no presente estudo.

O presente estudo investigou pela primeira vez a contribuição de polimorfismos de genes relacionados à metilação na associação clínica entre LES e periodontite em pacientes portadores das duas doenças. No entanto, muitos genes-alvo ainda precisam ser analisados. Assim, sugerimos novos estudos com maior tamanho amostral e com a realização da metilação global e outros alvos de investigação genéticos e epigenéticos, bem como a realização de estudos longitudinais multicêntricos para melhor avaliar a associação entre essas desordens.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os achados pode-se concluir que:

- a) O polimorfismo *DNMT3B* (rs2424913) está associado à ocorrência da periodontite, LES e LES + periodontite. O genótipo TT torna os indivíduos até 11-12 vezes mais suscetíveis ao LES e até 6 vezes mais suscetíveis à periodontite.
- b) O polimorfismo *MTHFR* (rs1801133) não está associado à periodontite e/ou LES.
- c) A condição periodontal dos pacientes com periodontite e LES + periodontite foi similar, assim como o número de dentes perdidos. Entretanto, pacientes com LES + periodontite apresentaram maior tempo de diagnóstico do LES.

REFERÊNCIAS

1. Mercado F., Marshall RI., Klestov AC., Bartold PM. Is there a relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease? *J Clin Periodontol.* 2000;27(4):267–72.
2. Sete MRC, Figueredo CM da S, Sztajn bok F. Periodontitis and systemic lupus erythematosus. *Rev Bras Reumatol.* 2016;56(2):165–70.
3. Calderaro DC, Ferreira GA, de Mendonça SMS, Corrêa JD, Santos FX, Sanção JGC, et al. Is there an association between systemic lupus erythematosus and periodontal disease? *Rev Bras Reumatol.* 2016;56(3):280–4.
4. Lopez R, Hujoel P, Belibasakis GN. On putative periodontal pathogens: an epidemiological perspective. *Virulence.* 2015;6(3):249–58.
5. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *J Clin Periodontol.* 2017;44:S94–105.
6. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010: A Systematic Review and Meta-regression. *J Dent Res.* 2014;93(11):1045–53.
7. Kornman KS. Mapping the Pathogenesis of Periodontitis: A New Look. *J Periodontol.* 2008;79(8):1560–8.
8. de Molon RS, Rossa C, Thurlings RM, Cirelli JA, Koenders MI. Linkage of periodontitis and rheumatoid arthritis: Current evidence and potential biological

- interactions. Vol. 20, International Journal of Molecular Sciences. 2019. 1–35 p.
9. Pessoa L, Aleti G, Choudhury S, Nguyen D, Yaskell T, Zhang Y, et al. Host-Microbial Interactions in Systemic Lupus Erythematosus and Periodontitis. *Front Immunol.* 2019;10.
 10. Rees F, Doherty M, Grainge MJ, Lanyon P, Zhang W. The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: A systematic review of epidemiological studies. *Rheumatol (United Kingdom).* 2017;56(11):1945–61.
 11. Vilar MJP, Rodrigues JM, Sato EI. Incidência de lúpus eritematoso sistêmico em Natal, RN - Brasil. *Rev Bras Reumatol.* 2003;43(6):347–51.
 12. Senna ER, Barros AN a LPDE, Silva EO, Costa IF, Pereira VB, Ciconelli RM, et al. Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil : A Study Using the COPCORD Approach. *J Rheumatol.* 2004;31(3):594–7.
 13. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9).
 14. Borba EF, Latorre LC, Brenol JCT, Kayser C, da Silva NA, Zimmermann AF, et al. Consenso de lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol.* 2008;48(4):196–207.
 15. Richard-Eaglin A, Smallheer BA. Immunosuppressive/Autoimmune Disorders. *Nurs Clin North Am.* 2018;53(3):319–34.
 16. Eyre S, Orozco G, Worthington J. The genetics revolution in rheumatology: Large scale genomic arrays and genetic mapping. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(7):421–32.
 17. Gurevitz SL, Snyder JA, Wessel EK, Frey J, Williamson BA. Systemic lupus erythematosus: A review of the disease and treatment options. *Consult Pharm.* 2013;28(2):110–21.
 18. Chatham WW, Kimberly RP. Treatment of lupus with corticosteroids. *Lupus.* 2001;10(3):140–7.
 19. Hammoudeh M, Al-Momani A, Sarakbi H, Chandra P, Hammoudeh S. Oral Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus Patients in Qatar: A Pilot Study. *Int J Rheumatol.* 2018;2018.
 20. Kobayashi T, Ito S, Yamamoto K, Hasegawa H, Sugita N, Kuroda T, et al. Risk of Periodontitis in Systemic Lupus Erythematosus Is Associated with Fcγ Receptor Polymorphisms. *J Periodontol.* 2003;74(3):378–84.
 21. Calderaro DC, Ferreira GA, Corrêa JD, Mendonça SMS, Silva TA, Costa FO, et al. Is chronic periodontitis premature in systemic lupus erythematosus patients? *Clin*

- Rheumatol [Internet]. 2017;36(3):713–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-016-3385-8>
22. Gofur NRP, Nurdiana N, Kalim H, Handono K. Periodontitis is associated with disease severity and anti-double stranded DNA antibody and interferon-gamma levels in patients with systemic lupus erythematosus. *J Taibah Univ Med Sci*. 2019;14(6):560–5.
 23. Wu Y Da, Lin CH, Chao WC, Liao TL, Chen DY, Chen HH. Association between a history of periodontitis and the risk of systemic lupus erythematosus in Taiwan: A nationwide, population-based, case-control study. *PLoS One*. 2017;12(10):1–11.
 24. Rutter-Locher Z, Smith TO, Giles I, Sofat N. Association between systemic lupus erythematosus and periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 2017;8(OCT).
 25. Fabbri C, Fuller R, Bonfá E, Borba EF. Periodontitis treatment improves systemic lupus erythematosus response to immunosuppressive therapy. *Clin Rheumatol*. 2014;33(4):505–9.
 26. Mutlu S, Richards A, Maddison P, Scully C. Gingival and periodontal health in systemic lupus erythematosus. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1993;21(3):158–61.
 27. Mendonça SMS, Corrêa JD, Souza AF, Travassos D V., Calderaro DC, Rocha NP, et al. Immunological signatures in saliva of systemic lupus erythematosus patients: influence of periodontal condition. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37(2):208–14.
 28. Rezaei M, Bayani M, Tasorian B, Mahdian S. The comparison of visfatin levels of gingival crevicular fluid in systemic lupus erythematosus and chronic periodontitis patients with healthy subjects. *Clin Rheumatol*. 2019;38(11):3139–43.
 29. Fernandes EGC, Savioli C, Siqueira JTT, Silva CAA. Oral health and the masticatory system in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16(9):713–9.
 30. Graves DT, Corrêa JD, Silva TA. The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. *J Dent Res*. 2018;98(2):148–56.
 31. Marques CPC, Maor Y. Possible evidence of systemic lupus erythematosus and periodontal disease association mediated by Toll-like receptors 2 and 4. 2015;187–92.
 32. Dayal AK, Kammer GM. THE T CELL ENIGMA IN LUPUS. *Arthritis Rheum*. 1996;39(1):23–33.
 33. Makar KW, Wilson CB. DNA Methylation Is a Nonredundant Repressor of the Th2 Effector Program. 2004;
 34. Sekigawa I, Kawasaki M, Ogasawara H, Kaneda K, Kaneko H, Takasaki Y, et al. DNA

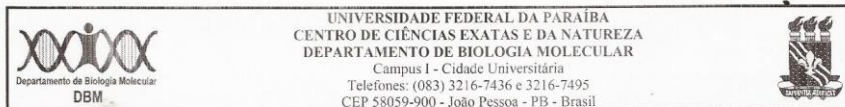
- methylation: Its contribution to systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Med*. 2006;6(3):99–106.
35. Deng C, Kaplan MJ, Yang J, Ray D, Zhang Z, Mccune WJ, et al. Decreased ras-mitogen-activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients. *Arthritis Rheum*. 2001;44(2):397–407.
 36. Ballestar E, Esteller M, Richardson BC. The Epigenetic Face of Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol*. 2006;176:7143–7.
 37. Salimi S, Keshavarzi F, Mohammadpour-Gharehbagh A, Moodi M, Mousavi M, Karimian M, et al. Polymorphisms of the folate metabolizing enzymes: Association with SLE susceptibility and in silico analysis. *Gene*. 2017;637:161–72.
 38. Sun M, Yang X, Xu W, Yao G, Pan H, Li M. polymorphisms with breast cancer risk in Han Chinese women from South China. 2012;11(4):4330–41.
 39. Zhang XM, Li S, Zhang QM. DNA methyltransferase 3B -149C / T polymorphism and the risk of laryngeal squamous cell carcinoma: a case-control study. 2015;14(4):12866–71.
 40. Zhong R, Chen Q, Zhang X, Li M, Zhang X, Lin W. Association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and lung cancer risk in Chinese people: An updated meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(24):e16037.
 41. Cai TT, Zhang J, Wang X, Song RH, Qin Q, Muhali FS, et al. Gene–gene and gene-sex epistatic interactions of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in autoimmune thyroid disease. *Endocr J*. 2016;63(7):643–53.
 42. Coêlho MC, Queiroz IC, Viana Filho JMC, Aquino SG de, Persuhn DC, Oliveira NFP de. miR-9-1 gene methylation and DNMT3B (rs2424913) polymorphism may contribute to periodontitis. *J Appl Oral Sci*. 2020;28:1–11.
 43. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: Isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet*. 1994;7(2):195–200.
 44. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome*. 1998;9(8):652–6.
 45. Zetterberg H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: Biological and clinical implications.

- Reprod Biol Endocrinol. 2004;2:1–8.
46. Liew SC, Gupta E Das. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet.* 2015;58(1):1–10.
 47. Zago MA. Carências de Folatos ou Vitamina B 12 . Anemias Megaloblásticas. In: *Tratado de Hematologia.* São Paulo: Atheneu; 2013. p. 125–34.
 48. Bestor, H T. The DNA methyltransferases of mammals. Vol. 9, *Human Molecular Genetics.* 2000. p. 2395–402.
 49. Gagliardi M, Strazzullo M, Matarazzo MR. DNMT3B functions: Novel insights from human disease. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6(OCT).
 50. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(2):143–53.
 51. Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(2):241–57.
 52. Jin SH, Guan XY, Liang WH, Bai GH, Liu JG. TLR4 polymorphism and periodontitis susceptibility A meta-analysis. *Med (United States).* 2016;95(36).
 53. Mohammadi S, Saghaeian Jazi M, Zare Ebrahimabad M, Eghbalpour F, Abdolahi N, Tabarraei A, et al. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms (rs1800896, rs1800871 and rs1800872) and haplotypes are associated with the activity of systemic lupus erythematosus and IL10 levels in an Iranian population. *Int J Immunogenet.* 2019;46(1):20–30.
 54. Zhang Z, Zheng Y, Li X. Interleukin-10 gene polymorphisms and chronic periodontitis susceptibility: Evidence based on 33 studies. *J Periodontal Res.* 2019;54(2):95–105.
 55. Strachan T, Read AP. *Genética Molecular Humana* [Internet]. 2nd ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. Available from: https://books.google.com.br/books?id=YeB_yqdju78C%0Ahttps://books.google.es/books?id=soyARAAACAAJ
 56. Pharoah PDP, Tyrer J, Dunning AM, Easton DF, Ponder BAJ, Abraham J, et al. Association between common variation in 120 candidate genes and breast cancer risk. *PLoS Genet.* 2007;3(3):0401–6.
 57. Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Zivelin A, Geffen E, et al. The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *Am J Hum Genet.*

- 2002;70(3):758–62.
58. Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: A thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet.* 1988;43(4):414–21.
 59. Niu YM, Deng MH, Chen W, Zeng XT, Luo J. MTHFR C677T gene polymorphism and head and neck cancer risk: A meta-analysis based on 23 publications. *Dis Markers.* 2015;2015.
 60. Liu Z, Wang L, Wang LE, Sturgis EM, Wei Q. Polymorphisms of the DNMT3B gene and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: A case-control study. *Cancer Lett.* 2008;268(1):158–65.
 61. Sirotti S, Generali E, Ceribelli A, Isailovic N, De Santis M, Selmi C. Personalized medicine in rheumatology: the paradigm of serum autoantibodies. *Autoimmun Highlights.* 2017;8(1).
 62. Oliveira NFP, Damm GR, Andia DC, Salmon C, Nociti FH, Line SRP, et al. DNA methylation status of the IL8 gene promoter in oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009;36(9):719–25.
 63. Andia DC, de Oliveira NFP, Casarin RCV, Casati MZ, Line SRP, de Souza AP. DNA Methylation Status of the IL8 Gene Promoter in Aggressive Periodontitis . *J Periodontol.* 2010;81(9):1336–41.
 64. Farivar S, Aghamaleki FS. Effects of major epigenetic factors on systemic lupus erythematosus. *Iran Biomed J.* 2015;22(5):294–302.
 65. Long H, Yin H, Wang L, Gershwin ME, Lu Q. The critical role of epigenetics in systemic lupus erythematosus and autoimmunity. *J Autoimmun.* 2016;74:118–38.
 66. Wang Z, Chang C, Peng M, Lu Q. Translating epigenetics into clinic: Focus on lupus. *Clin Epigenetics.* 2017;9(1):1–15.
 67. Hurtado C, Acevedo Sáenz LY, Vásquez Trespalacios EM, Urrego R, Jenks S, Sanz I, et al. DNA methylation changes on immune cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmunity.* 2020;0(0):1–8.

5 ANEXOS

5.1 ANEXO 1



João Pessoa, 23 de novembro de 2018

A quem possa interessar:

Eu, Naila Francis Paulo de Oliveira professora da Universidade Federal da Paraíba, coordenadora do Laboratório de Genética Molecular Humana do Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, autorizo a aluna Larissa Dias do Programa de Pós Graduação em Odontologia da UFPB a realizar as atividades de seu projeto intitulado "Associação entre doença periodontal e lúpus eritematoso sistêmico: investigação de aspectos clínicos e genéticos" no Laboratório acima citado.

Sem mais, me despeço e me coloco a disposição para quaisquer dúvidas.

Att,

A circular stamp from the 'DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR - CAMPUS I - CEN' is placed over a handwritten signature in blue ink. Below the signature, the text 'Prof.ª Naila Francis Paulo de Oliveira' and 'Matrícula Siae 18127408' is printed.

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Biologia Molecular
Laboratório de Genética Molecular Humana
Cidade Universitária - Campus I
João Pessoa-PB
Brasil
CEP 58051-900
Phone: +55 83 3216-7643
nailafpo@gmail.com

5.2 ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E ODONTOLOGIA SOCIAL
CLÍNICA DE PERIODONTIA

CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos, para os devidos fins, que aceitaremos a pesquisadora Larissa Nadine Silva Dias, do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, para desenvolver o seu projeto de pesquisa "Associação entre doença periodontal e lúpus eritematoso sistêmico: investigação de aspectos clínicos e genéticos", sob a orientação da Profª Drª Sabrina Garcia de Aquino, na clínica de Periodontia da Universidade Federal da Paraíba.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento, pela pesquisadora, dos requisitos da Resolução 466/12 CNS e suas complementares, comprometendo-se a mesma a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

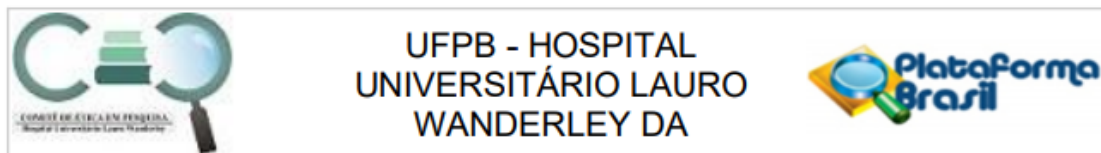
Antes de iniciar a coleta de dados, a pesquisadora deverá apresentar a esta Instituição o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

João Pessoa, 30 de novembro de 2018.

Assinatura e carimbo do responsável

Dr. Enayto S. Crispim Silva
Implantodontista
CRO 3689

5.3 ANEXO 3



Continuação do Parecer: 3.100.993

/ Brochura Investigador	PROJETO.pdf	23:06:28	Dias	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ANUENCIA.pdf	02/12/2018 23:05:40	Larissa Nadine Silva Dias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	02/12/2018 22:50:01	Larissa Nadine Silva Dias	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 21 de Dezembro de 2018

Assinado por:
MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE
 (Coordenador(a))

6 APÊNDICES

6.1 Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a),

Esta pesquisa é sobre genética, doenças que acometem a cavidade bucal e o lúpus eritematoso sistêmico e está sendo desenvolvida pela mestrandia Larissa Nadine Silva Dias do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação da Prof^a Sabrina Garcia de Aquino.

O objetivo do estudo é identificar possíveis alterações no DNA (a molécula que guarda a nossa informação genética) em pacientes que apresentam periodontite (na gengiva) e/ou lúpus eritematoso sistêmico.

A finalidade deste trabalho é contribuir para o entendimento do processo de desenvolvimento da doença, visando indiretamente contribuir para o desenvolvimento de diagnóstico e tratamento.

Solicito a sua colaboração para responder algumas perguntas sobre a saúde e doação de células da boca. As células serão coletadas a partir de um bochecho por 1 minuto com solução esterilizada de açúcar. Solicito também a sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome, bem como do doador será mantido em sigilo. Informo que há um risco mínimo de o senhor (a) não gostar do gosto da solução para o bochecho e/ou se sentir desconfortável ao fazer o bochecho.

Esclareço que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o (a) senhor (a) não é obrigado (a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador (a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na instituição.

A pesquisadora estará a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido (a) e dou meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

Assinatura do Participante da Pesquisa ou Responsável Legal

Assinatura da Testemunha



Espaço para impressão dactiloscópica

Contato com a Pesquisadora Responsável:

Caso necessite de mais informações sobre o presente estudo, favor ligar para a pesquisadora: Sabrina Garcia de Aquino – (83) 3216-7251 - Endereço (setor do trabalho): Centro de Ciências da Saúde/ Departamento de Clínica e Odontologia Social ou para o Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley - Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW – 2º andar. Cidade Universitária. Bairro: Castelo Branco – João Pessoa - PB. CEP: 58059-900. E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com - Campus I – Fone: 3216-7964.

Atenciosamente,



Assinatura da Pesquisadora Responsável

6.2 Ficha para coleta de dados



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Nº da amostra: _____

Nome: _____

Sexo: F M

Idade: _____

Cor: M P B

Endereço: _____

Cidade: _____

Estado: _____

Telex: _____

Cel: _____

DADOS CLÍNICOS SOBRE SAÚDE GERAL

Doença crônica? S N (não aceitar diabetes). Qual? _____

Diabetes na família? S N Grau de parentesco? _____

Câncer na família? S N Qual? _____ Parentesco? _____

Alguma outra doença na família? Qual? Grau de parentesco? _____

Uso de medicamentos? S N Qual? _____

É alérgico a algum medicamento? Qual? _____

Fumante? S N Quantos cigarros/dia? _____ Quantos anos? _____

Fumante passivo? S N

Ex-fumante? S N Quantos cigarros/dia? _____ Quantos anos? _____

Parou há quanto tempo? _____

Consome álcool? S N Qual frequência? Quanto? _____

DADOS CLÍNICOS SOBRE SAÚDE BUCAL

É portador de doença na gengiva? S N Há quanto tempo? _____
 Já realizou algum tratamento na gengiva? S N
 Que tipo? _____ Quando? _____
 Sangramento gengival com facilidade? S N
 Histórico de doença periodontal na família? Parentesco? _____
 Sente seus dentes inseguros? S N
 Seus dentes doem? S N Região: _____
 Halitose? S N
 Tem com frequência: afta, herpes labial ou ferida na boca e lábios? S N
 Os alimentos prendem-se entre os dentes? S N Região: _____
 Usa fio dental? S N Frequência: _____
 Usa palito? S N Frequência: _____
 Frequência de escovação: _____
 Tipo de escova: _____
 Outros meios de higiene: _____
 Hábito anormal de mordida? S N Especificar: _____
 Mastigação unilateral? N Direito Esquerdo
 Pressão lingual: S N Bruxismo: S N Respiração bucal? S N
 Dor nos músculos mastigatórios? S N Especificar: _____
 Dor ou ruído na ATM: S N Especificar: _____

 Assinatura do paciente: _____
 Data: ____/____/____

