UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Igiene Dentale

RUOLO DELL'EPIGENETICA NELLA PARODONTITE

Relatore: Chiar.mo

Prof. **PIVA FRANCESCO**

Tesi di Laurea di:

LAPPI MARTINA

Correlatore: Chiar.ma

Prof.ssa **SPARABOMBE SCILLA**

A.A. 2019/2020

A te mamma,

che mi hai insegnato a crescere e a superare le difficoltà

INDICE

INTRODUZIONE **3**

CAPITOLO 1 ..... **6**

Parodontite **6**

P.1.1 Classificazione delle malattie e condizioni Parodontali e Peri-Implantari 2017 6

P.1.2 Patogenesi 10

P.1.3 Fattori di rischio 18

P.1.4 Ereditarietà 23

CAPITOLO 2 ..... **25**

Meccanismi Epigenetici nei diversi tessuti **25**

P.2.1 Meccanismi epigenetici di base 25

P.2.1.1 Epigenoma e Tessuti 26

P.2.1.2 Pazienti con lo stesso fenotipo clinico rispondono in maniera diversa al trattamento 28

P.2.2 Ereditarietà delle modificazioni epigenetiche 29

CAPITOLO 3 ..... **32**

Correlazione tra Epigenetica e Parodontite **32**

P.3.1 Premessa: fattori ambientali 32

P.3.2 Ultime ricerche sull'Epigenetica 33

P.3.3 Isole CpG e geni coinvolti 36

P.3.4 Polimorfismi 47

P.3.4.1 Geni e polimorfismi che coinvolgono interleuchine e citochine pro infiammatorie 48

P.3.5 Enzimi e Proteine 52

P.3.6 Fumo, diabete, alimentazione e stress 53

P.3.7 Ruolo dei batteri patogeni parodontali 55

CAPITOLO 4 ..... **61**

Applicazione clinica dell'Epigenetica nel campo della Parodontite **61**

P.4.1 Cambiamenti nell'approccio e visione del paziente 61

P.4.2 Nuovi possibili metodi di diagnosi e trattamento 61

P.4.2.1 Test Genetici 62

P.4.2.2 Tamponi buccali 66

P.4.2.3 Biopsia 68

P.4.2.4 Epidrugs 69

P.4.2.4.1 Ingegneria dei tessuti 71

Conclusioni **74**

Bibliografia **77**

INTRODUZIONE

Lo scopo della Tesi è quello di mostrare come l'approccio olistico, nel trattamento di un paziente in ambito odontoiatrico, permette di avere una visione globale della salute in cui si considera la complessità e la diversità dell'organismo.

Il termine olistico significa "totalità", per questo, quando si deve trattare una patologia quale la parodontite bisogna tenere in considerazione tutti gli aspetti della vita del paziente:

lo stress, le abitudini viziate, l'alimentazione, le condizioni familiari, l'ambiente e la genetica [1].

Un paziente, a parità di malattia, può essere molto diverso da un altro in termini di prognosi o addirittura anche all'interno dello stesso individuo ci possono essere differenze significative. Questo trova spiegazione nel fatto che l'espressione dei geni di una cellula può cambiare nel tempo senza che si verifichino alterazioni della sequenza del DNA, a causa di processi di regolazione dell'espressione genica che vanno sotto il nome di "epigenetica".

I meccanismi epigenetici regolano l'espressione dei geni e sono fondamentali affinchè l'informazione contenuta nel DNA venga tradotta in proteina nella giusta quantità.

Esistono due tipi di meccanismi attraverso i quali si può regolare l'espressione genica per via epigenetica. Nel primo caso rientrano quelle modifiche del DNA, precisamente la metilazione delle citosine, in grado di alterare l'espressione dei geni. ll secondo meccanismo si basa sull'associazione di proteine istoniche al DNA, che è in grado di mascherare determinati geni all'apparato di trascrizione.

Se questi meccanismi sono alterati, possono provocare l'insorgenza di diverse malattie.

Grazie a queste nuove acquisizioni e poiché l'ambiente influenza l'epigenetica, si può dire che il DNA "è anche quello che mangiamo, cosa respiriamo, cosa pensiamo, le emozioni che proviamo, il tipo di vita che conduciamo: questi sono i fattori che modificano e plasmano le nostre risposte geniche e contribuiscono a definire quale sarà il nostro aspetto, il metabolismo, le malattie a cui andremo incontro" [2].

Secondo i paradigmi dell'epigenetica, gli stimoli ambientali sono in grado di produrre modificazioni, anche a lungo termine nell'espressione di alcuni geni, e alcune di queste sono trasmissibili alle generazioni future [3].

Un'altra scoperta recente riguarda la differenza del livello di metilazione del genoma da un organo/tessuto ad un altro dello stesso individuo.[4]

La Parodontite, avendo eziologia multifattoriale è strettamente dipendente dai cambiamenti epigenetici.

Per questo è importante fare un'accurata anamnesi, individuare tutti i possibili fattori di rischio e domandarsi se la patologia che si presenta nel cavo orale è dovuta anche a problematiche in altri distretti corporei. L'igienista non deve limitarsi al trattamento parodontale non chirurgico, ma deve occuparsi di fare educazione alla salute promuovendo stili di vita sani che rappresentano il miglior modo di fare prevenzione, favorendo di conseguenza la salute generale.

Da queste conoscenze, nasce la necessità di elaborare novi metodi di trattamento e diagnosi. Tuttavia, non sono ancora in uso per individuare la metilazione del DNA in siti specifici della gengiva tramite il tampone buccale, anche se gli studi sono incoraggianti.

Questo nuovo approccio che considera il paziente nella sua totalità permette di ampliare la visione clinica dell'igienista dentale, e consente l'elaborazione di piani di trattamento personalizzati che possono avere un maggior successo nella cura.

CAPITOLO 1

Parodontite

La parodontite viene definita come *un'infiammazione cronica multifattoriale associata a una disbiosi del biofilm della placca e caratterizzata da una progressiva distruzione dell'apparato osseo di supporto. Inizialmente include la perdita del tessuto di supporto parodontale, che si manifesta con CAL (perdita di attacco clinico) radiograficamente associato a una perdita di osso, presenza di tasca parodontale e sanguinamento gengivale* [5].

È una patologia molto diffusa, ed è considerata come un problema di salute pubblico perché può portare a perdita di denti, alterazione della funzione masticatoria, può influire negativamente sull'estetica e può portare problemi nelle relazioni sociali.

P.1.1 Classificazione delle malattie e condizioni Parodontali e Peri-Implantari 2017

La nuova classificazione del world workshop del 2017 definisce le condizioni e malattie parodontali come l'insieme di tre grandi gruppi: salute parodontale e malattie gengivali, parodontiti e altre condizioni che affliggono il parodonto.

All'interno del gruppo parodontiti, sono presenti malattie parodontali necrotizzanti, parodontiti come manifestazione di malattie sistemiche e parodontiti divise in stadi e gradi.

Inoltre, si definiscono la Perimplantite e la Mucosite, condizioni patologiche legate a placca che si possono verificare attorno agli impianti.

È stato introdotto il concetto di salute parodontale clinica ovvero quando il sanguinamento al sondaggio (Bop) è minore del 10%, la profondità del solco non è oltre i 3 mm, il livello dell'altezza della cresta ossea è normale e i fattori predisponenti e che modificano la risposta sono sotto controllo.

La salute parodontale può esistere anche in un parodonto ridotto, cioè con ridotto attacco clinico [6].

È stato precisato che un paziente parodontale rimane tale per sempre, la diagnosi è irreversibile, mentre nella gengivite è reversibile [7].

Nella precedente classificazione di Armitage del 1999 le parodontiti erano divise in croniche, aggressive, come manifestazione di malattie sistemiche, necrotizzanti, da ascessi, associata a lesioni endodontitiche, e deformità e condizioni acquisite di sviluppo [8].

Per parodontite aggressiva si intendeva quella forma rara e grave che può comparire anche in età precoce con la caratteristica della rapidità di progressione, l'aggregazione familiare e la presenza di poco biofilm rispetto alla severità con cui si manifestava. Spesso veniva infatti associata a un fenotipo infiammatorio iper-reattivo: meccanismi di difesa dell'ospite esuberanti.

Per parodontite cronica si intendeva quella forma causata principalmente da placca batterica, che colpiva gli adulti e con un'estensione e severità che aumentava con l'età.

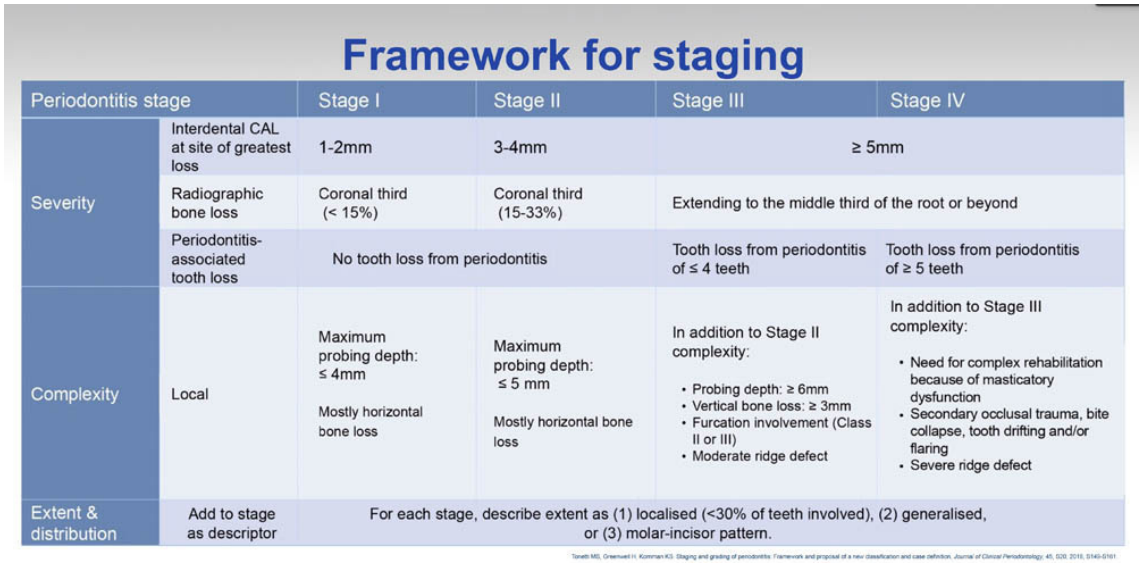
Il riassorbimento osseo era lento e ad andamento progressivo.

Dal 2017, sono state abolite le distinzioni tra parodontite aggressiva e cronica, ma la vasta eterogeneità della manifestazione fenotipica della patologia è stata compensata con l'aggiunta di stadi, gradi ed estensione e distribuzione [9].

Negli stadi (Figura 1) viene descritta la gravità della malattia e la complessità della gestione del trattamento mentre i gradi danno informazioni sulle caratteristiche biologiche, la valutazione del rischio di ulteriore progressione, gli scarsi esiti del trattamento e i fattori che possono influenzare negativamente la salute generale del paziente.

La novità sulla quale bisogna fare più attenzione è l'introduzione dei fattori di rischio (fumo e diabete) per definire e classificare un paziente in un grado [10].

Inoltre, si prende in considerazione il fenotipo: se la distruzione ossea dei tessuti è correlata alla presenza di poca o molta placca (Figura 2) [11].



Framework for staging

Periodontitis stage		Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
Severity	Interdental CAL at site of greatest loss	1-2mm	3-4mm	≥ 5mm	
	Radiographic bone loss	Coronal third (< 15%)	Coronal third (15-33%)	Extending to the middle third of the root or beyond	
	Periodontitis-associated tooth loss	No tooth loss from periodontitis		Tooth loss from periodontitis of ≤ 4 teeth	Tooth loss from periodontitis of ≥ 5 teeth
Complexity	Local	Maximum probing depth: ≤ 4mm Mostly horizontal bone loss	Maximum probing depth: ≤ 5 mm Mostly horizontal bone loss	In addition to Stage II complexity: • Probing depth: ≥ 6mm • Vertical bone loss: ≥ 3mm • Furcation involvement (Class II or III) • Moderate ridge defect	In addition to Stage III complexity: • Need for complex rehabilitation because of masticatory dysfunction • Secondary occlusal trauma, bite collapse, tooth drifting and/or flaring • Severe ridge defect
Extent & distribution	Add to stage as descriptor	For each stage, describe extent as (1) localised (<30% of teeth involved), (2) generalised, or (3) molar-incisor pattern.			

Figura 1. Stadi della nuova classificazione delle malattie e condizioni Parodontali e Perimplantari 2017.

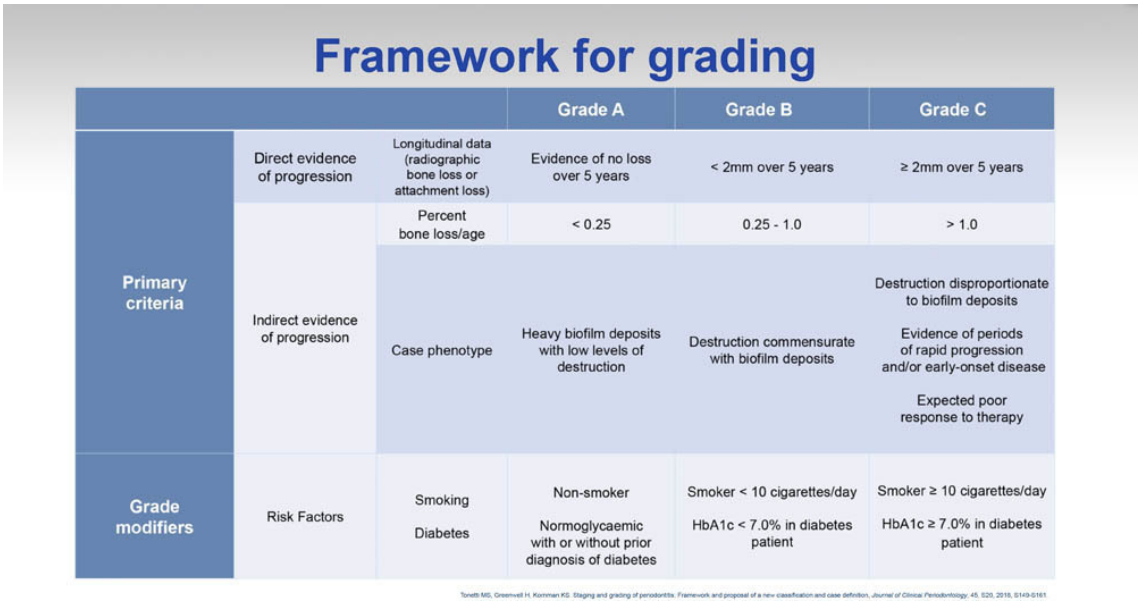


Figura 2. Gradi della nuova classificazione delle malattie e condizioni Parodontali e Perimplantari 2017.

All'interno della categoria delle deformità acquisite e di sviluppo nel gruppo di condizioni che affliggono il parodonto, è stato sostituito il termine biotipo con fenotipo gengivale, identificato attraverso tre caratteristiche:

biotipo gengivale, ovvero l'insieme dello spessore dei tessuti gengivali e l'ampiezza del tessuto cheratinizzato, morfotipo osseo e anatomia dentale.

Si possono identificare tre diversi tipi di fenotipo: fenotipo sottile e festonato, spesso e piatto e spesso e festonato.

Infine, è stato specificato che il sanguinamento al sondaggio (BOP) è il primo parametro per valutare la presenza di gengivite [12].

P.1.2 Patogenesi

La patogenesi è lo studio dei modi e dei processi fisiopatologici attraverso cui avvengono le alterazioni dello stato fisiologico che portano allo stabilirsi e allo svilupparsi della malattia.

Gli esperti concordano sul fatto che la parodontite è iniziata e perpetuata da un piccolo gruppo di batteri prevalentemente gram-negativi, anaerobici o microaerofili che colonizzano l'area sottogengivale [13].

Socransky et al. (1998), affermano che la malattia risulta dalle interazioni tra i meccanismi di difesa dell'ospite con i processi batterici contenuti nel biofilm.

L'ufficiale definizione del world workshop 2017 introduce il concetto di disbiosi batterica.

Esiste una relazione simbiontica tra i patogeni parodontali presenti nel biofilm.

Una variazione di concentrazione, numero e prevalenza provoca uno squilibrio dei batteri che influisce sullo stato di salute orale.

Oltre 300 specie batteriche sono riconosciute come residenti permanenti della cavità orale [14]. Pochissimi di questi batteri causano infezione in soggetti sani.

Questo è dato dalla difesa efficiente dell'ospite che monitora costantemente lo stato di colonizzazione batterica. Esiste un equilibrio dinamico tra i batteri della placca e il sistema innato di difesa dell'ospite.

I batteri hanno acquisito strategie di sopravvivenza nel cavo orale mentre l'ospite limita la loro crescita con risposte immunitarie innate e adattive.

Questa interazione non è un processo casuale, ma è altamente evoluto: i batteri rilasciano antigeni che l'ospite riconosce come stranieri e risponde di conseguenza.

In condizioni di salute, questi batteri della placca non provocano infiammazione.

In altre determinate condizioni, possono comportare l'acquisizione di alcune specie o una combinazione diversa di specie, dove sono maggiormente presenti i batteri più pericolosi che, insieme a una difesa dell'ospite compromessa, possono provocare l'insorgenza di infiammazione distruttiva.

Il gruppo di lavoro del World Workshop di Clinical Periodontics del 1996 conclude che *Porphyrornonas gingivalis, Bacteroides forsythus e Actinobacillus actinornyceterncornitans* sono i batteri principali della Parodontite [15].

Le specie batteriche si aggregano fino a formare il biofilm, considerato come una struttura di cellule batteriche racchiuse in una matrice polimerica autoprodotta e aderente a una superficie inerte o vivente. Il biofilm della placca si è adattato per crescere in una nicchia ecologica altamente specializzata. Inoltre, gli stessi membri del biofilm partecipano alla sua estensione. La resistenza del bioflm sottogengivale alle normali difese dell'ospite ne consegue che non può essere rimosso con semplici manovre di igiene domiciliare, ma manovre fisiche quali la terapia meccanica non chirurgica.

In conclusione, si può affermare che il biofilm della placca è uno dei fattori eziologici principali.

Nel 1965, Brandtzaeg e Kraus, dimostrano che i *meccanismi immunitari adattivi giocano un ruolo nella patogenesi dell'infiammazione parodontale.*

Successivamente, nel 1970 Ivanyi e Lehner hanno evidenziato il ruolo dell'immunità innata cellulo mediata.

Nel 1979 è stato proposto da Seymour et al., che la parodontite consiste in un passaggio da una lesione gengivale con maggiori cellule T a una lesione che presenta maggiori cellule B e plasmacellule.

La distribuzione in percentuale delle cellule infiammatorie nella parodontite è presentata in Figura 3 [16].

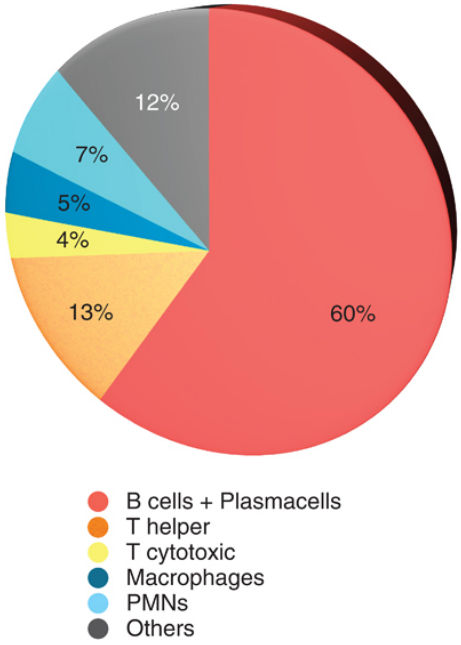


Figura 3. Le cellule B e i loro sottogruppi plasmatici rappresentavano circa il 60% delle cellule della lesione, mentre le cellule T citotossiche e T helper presentavano rispettivamente frazioni del 13% e 4%. Le proporzioni di cellule PMN (polimorfonucleati) e macrofagi nelle lesioni della parodontite erano rispettivamente di circa il 7% e il 5%.

Lo sviluppo della Parodontite può essere classificato in 4 passaggi: iniziale, precoce, stabilizzata, avanzata [17].

La lesioni stabilizzata è soprattutto una lesione da linfociti o plasmacellule.

Per la maggioranza, i linfociti sono cellule B portatrici di immunoglobuline, il restante 30% è costituito da cellule T.

Mentre la lesione a cellule T è confinata alla gengiva, quella a cellule B causa la formazione di tasca parodontale con distruzione del tessuto connettivo, perdita di attacco connettivale e migrazione apicale dell'epitelio giunzionale.

I neutrofili polimorfonucleati formano una barriera tra i tessuti e il biofilm della placca.

L'ulteriore ingresso di prodotti batterici causa una produzione di citochine infiammatorie: Interleuchina 1 (IL-1), fattore di necrosi tumorale alfa (TNFalfa) e prostaglandina E2 (PGE2) con conseguente distruzione del tessuto connettivo e dell'osso.

Nella lesione avanzata la perdita di attacco è evidente clinicamente e istologicamente.

I fibroblasti, stimolati da citochine pro-infiammatorie, producono MMP che hanno lo scopo di degradare la matrice extracellulare e con l'avanzare della lesione, si presenta anche il riassorbimento dell'osso.

La parodontite nell'uomo, si pensa essere mediata da un bilanciamento tra cellule Th1 e Th2. La progressione della patologia avviene quando c'è uno sbilanciamento verso Th2. Questo può dipendere rispettivamente da una forte o da una scarsa risposta immune innata.

La gengivite e la lesione stabilizzata possono essere mediate dalle cellule Th1 che aumentano l'attività dei macrofagi di uccidere i patogeni e attivano i PMN nel sito infiammato che permettono il controllo dell'infezione.

La presenza di cellule Th1 può essere favorita anche dalle cellule natural killer (NK).

La parodontite invece, viene associata alla presenza di una risposta con cellule Th2, mediante l'attivazione di cellule B.

Sono presenti numerose citochine che svolgono ruoli chiave nella fisiopatologia, quali: interleuchina (IL) -1b, fattore di necrosi tumorale a (TNF-a), IL-6 e RANKL.

L’interleuchina 1 stimola l’espressione di molti geni associati all’infiammazione e alle malattie immunitarie.

L’interleuchina 6 stimola la formazione degli osteoclasti.

Dati più recenti evidenziano un ruolo pro-infiammatorio dell'IL-10 nella parodontite, attivando i linfociti B, oltre alla sua funzione antinfiammatoria di soppressione delle risposte Th1 e Th2.

Nella figura 4 sono state incluse anche IL-32, -33, -37 anche se il ruolo ancora non è del tutto chiaro.

È probabile che le reti di citochine controllino lo sviluppo e la plasticità delle cellule T nelle lesioni parodontali (Ford et al. 2010). Le variazioni di queste possono avere un impatto notevole sul fenotipo-cellula T e sull'espressione della malattia.

A causa dell'eterogeneità genetica, ambientale, epigenetica e del microbiota, è altamente probabile che vi sia una variazione individuale nell'espressione e nei profili delle citochine, come indicato in Figura 4 [18]. Ciò potrebbe influire sulla suscettibilità, sulla gravità e sull'esito della patologia.

Se queste variazioni si conoscessero, sarebbe possibile attuare terapie mirate e individuali.

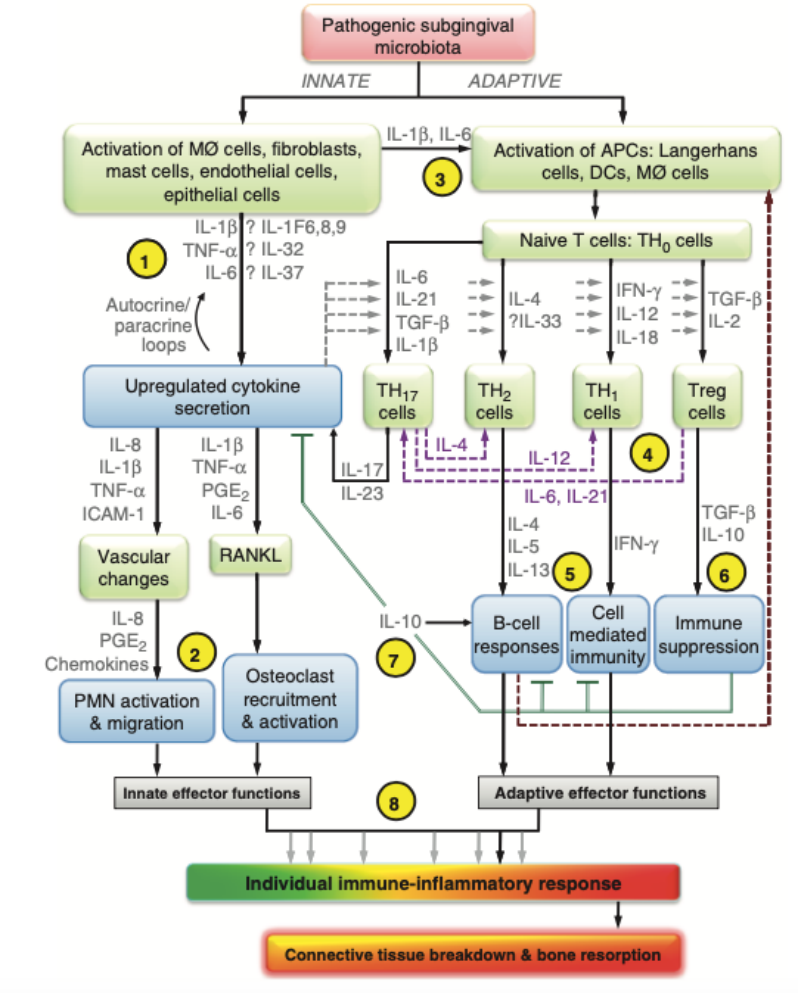


Figura 4. Reti di citochine nelle Malattie Parodontali.

(1)le cellule del parodonto rispondono ai MAMP tramite PRR producendo citochine come fase iniziale delle risposte immunitarie innate.

(2)l'attività sovraregolata delle citochine porta a cambiamenti vascolari, attivazione e migrazione PMN e attivazione osteoclasti.

(3) le citochine contribuiscono all'attivazione degli APC. Questi presentano antigeni specifici del CD4+ e le cellule T (Th0) si differenziano in cellule T effettrici (es. cellule Th2, Th1, Th17, Treg) secondo la citochina presente nell'ambiente (come indicato dalle frecce grigie tratteggiate orizzontali e parallele).

(4) Th1 e Th2 hanno un fenotipo relativamente stabile, ma possono mostrare plasticità sotto influenza di diverse citochine nell'ambiente (come indicato dalla freccia viola tratteggiata).

(5) diversi sottogruppi di cellule T sono associati a vari profili di secrezione di citochine che regolano diversi aspetti della risposta immunitaria e contribuiscono all'attività di sovraregolazione delle citochine.
(6) le cellule Treg secernono TGF-b e IL-10 che hanno funzioni immunosoppressive. Ad esempio, IL-10 sopprime le risposte Th1 e Th2.
(7) IL-10 può avere anche un'azione immunostimolante, perché può attivare i linfociti B.
(8) la somma totale delle funzioni effettive innate e adattive risulta in una risposta immuno-infiammatoria che varia da persona a persona (come indicato dalle frecce grigie, alcuni pazienti sono più suscettibili alle malattie di altri) e nel tempo all'interno dell'individuo (la freccia nera indica una risposta pro-infiammatoria che porta distruzione del tessuto connettivo e riassorbimento osseo).

Possiamo concludere che il modello proposto da Page & Kornmann nel 1997 è attualmente il più indicato per descrivere la patogenesi della parodontite perché considera alla base una componente batterica di disbiosi orale, associata però a un'alterata risposta dell'ospite che sembra essere il fattore preponderante [19].
L'insulto batterico determina una risposta infiammatoria dell'ospite che a sua volta causa un'alterazione del metabolismo e la distruzione dei tessuti ossei e connettivi con la conseguente manifestazione e sviluppo della malattia (Figura 5) .

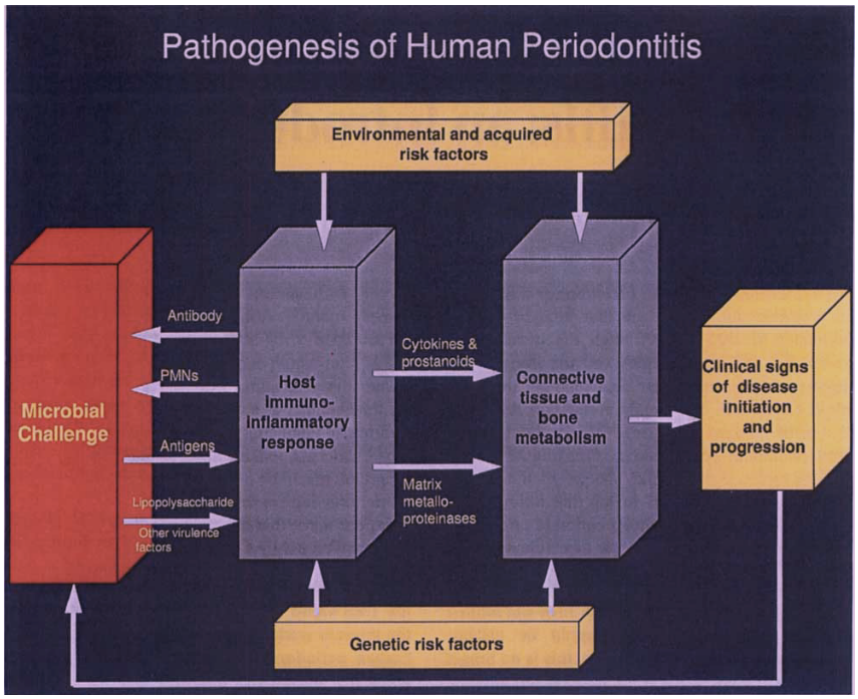


Figura 5. Patogenesi della Parodontite umana

È enigmatico che gli stessi sistemi che forniscono protezione e difesa possono essere anche responsabili della distruzione.

Questi concetti suggeriscono che la malattia può essere più distruttiva se aspetti specifici dei meccanismi di difesa dell'ospite all'interno del tessuto locale sono più esuberanti. Ciò sembra accadere, almeno in parte, a causa di fattori iper-reattivi dell'ospite, sia intrinseci (genetici) che indotti (come il fumo), o all'aumentata stimolazione batterica all'interno dei tessuti come risultato di meccanismi di controllo batterico compromessi a livello del solco gengivale [20].

P.1.3 Fattori di rischio

I fattori di rischio influenzano la salute orale e svolgono un ruolo importante nella risposta di un individuo all'infezione parodontale.

Se identificati e analizzati, aiutano a fare prevenzione e a capire che tipo di trattamento bisogna seguire.

La parodontite è una patologia complessa, che riconosce un'eziologia multifattoriale.

L'effetto e l'interazione diversa negli individui fa parte della complessità umana e dell'eterogeneità fenotipica delle malattie complesse.

E' noto come la presenza dell'agente microbico (condizione necessaria) non sia sempre accompagnato da segni e sintomi caratteristici di quella patologia. Per questo, l'agente microbico di per sé non è sufficiente a provocare alcuna manifestazione della patologia.

L'insorgenza o meno della patologia dipende da fattori multipli.

Il primo livello riguarda l'origine: genetici, ambientali, acquisiti e locali.

Il secondo livello riguarda la possibilità di poterli eliminare o diminuire: modificabili e non modificabili.

I fattori modificabili sono le abitudini viziate come il fumo, gli ambientali come lo stress e l'alimentazione scorretta. Su questi fattori è possibile intervenire promuovendo uno stile di vita corretto.

Tra i fattori acquisiti troviamo il diabete: è ormai chiaro il collegamento e l'influenza reciproca tra diabete e parodontite [21]. I pazienti con livelli glicemici inadeguati sono più predisposti alla malattia e anche a una ridotta risposta alla terapia.

Nei pazienti diabetici c'è un aumento di perdita di attacco clinico dovuto a una diminuita capacità differenziativa e proliferativa delle cellule del tessuto connettivo e osseo. Oltre

all'inibizione degli osteoblasti, della produzione di collagene e di matrice extracellulare avvengono anche cambiamenti strutturali nella microvascolarizzazione.

Inoltre, c'è un aumento di accumulo di AGE (prodotti finali di glicosilazione) che possono provocare un fenotipo distruttivo, eccessivo rilascio di citochine e un ritardo nella guarigione.

La relazione è doppia: anche la malattia parodontale influenza il diabete.

I meccanismi attraverso la quale la malattia parodontale influenza il diabete sono l'innalzamento dei livelli glicemici che peggiorano le condizioni di un paziente diabetico, che presenta anche uno stato di infiammazione cronica sistemica che causa un insulino resistenza nelle settimane e mesi successivi.

Obesità e sindrome metabolica sono anch'essi fattori acquisiti [22] [23] [24].

Il meccanismo alla base per il quale le persone obese sono maggiormente predisposte alle malattie parodontali sono il coinvolgimento del tessuto adiposo nell'infiammazione.

Gli adipociti rilasciano molecole infiammatorie mantenendo costante il livello di stress ossidativo.

La sindrome metabolica è data dall'insieme di obesità, resistenza insulinica, alterazione metabolismo lipidico, ipertensione.

Tra i fattori ambientali c'è il fumo [25] e lo stress [26] .

Un paziente fumatore ha il doppio della possibilità di perdita di denti rispetto a un non fumatore, ed è considerato il fattore principale nella risposta alla terapia, tanto che nella nuova classificazione viene preso in considerazione come un fattore modificatore della risposta al trattamento insieme al diabete. Esiste infatti una relazione diretta tra quantità di sigarette fumate e gravità della malattia.

Il fumo causa principalmente una severità nella perdita di attacco clinico, aumento dei polimorfonucleati, inibizione delle funzioni difensive e rilascio di elastasi nei tessuti.

Lo stress è considerato un altro fattore di rischio della parodontite.

Lo stress cronico provoca un'alterazione della risposta immunitaria e rallenta il processo di guarigione delle ferite a causa dell'alterazione dei livelli di citochine e di cortisolo.

Quest'ultimo, è stato trovato ad alti livelli in pazienti con malattia parodontale [27].

Fattori locali comprendono quelli funzionali (paziente respiratore orale), meccanici (inadeguate manovre igiene) anatomici (malposizioni, prossimità radicolare, proiezioni e perle smalto, solchi,..) e fattori iatrogeni.

I fattori non modificabili sono la predisposizione genetica, stato immunitario e necessità di assunzione di farmaci [28].

Ci sono diversi farmaci che posso influire per l'insorgenza e l'aggravarsi della malattia quali:

contraccettivi orali, antiepilettici, ciclosporina, calcio antagonisti, bloccanti dei canali di ferro e antipertensivi [29 30].

Negli ultimi decenni studi hanno dimostrato che la presenza dei batteri da sola non induce sempre perdita di attacco parodontale, ma che anche i fattori dell'ospite sono necessari per la parodontite.

È sorta dunque l'ipotesi secondo la quale la parodontite potrebbe avere un quadro genetico sottostante.

Questo è stato confermato da diversi studi.

Loe et al. (1896), hanno analizzato la storia della malattia in una popolazione dello Sri Lanka priva di assistenza odontoiatrica e in assenza di adeguata manovre di igiene orale

quotidiana. Sono stati identificati 3 gruppi: un gruppo senza progressione (11%), un gruppo con progressione moderata (81%), e un gruppo con progressione veloce (8%).

Con il tempo quindi, si è concretizzata l'ipotesi che la suscettibilità dell'ospite potesse avere uno sfondo genetico in quanto la risposta antimicrobica è variabile e in parte definita da geni.

I leucociti polimorfonucleati hanno un ruolo fondamentale nel sistema immunitario dell'individuo perché mantengono lo stato di salute [31].

Esistono prove in vitro che componenti del biofilm orale, tra cui Aggregatibacter actinomycetemcomansans leukotoxin (che può uccidere i PMN), proteasi e altre molecole di derivazione microbica come LPS e prodotti di scarto, possono modificare funzioni di PMN portandolo a migrazione o apoptosi.

Un fenotipo iperattivo dei neutrofili, può portare alla distruzione dei tessuti e il rilascio di prodotti tossici come enzimi, citochine e radicali liberi nel tessuto parodontale.

L'iperattività dei PMN si riferisce a un elevato livello di attività basale.

Al momento non è del tutto chiaro come gli stati dei PMN iperattivi siano in relazione con la suscettibilità alla parodontite. Questo può avvenire, anche in assenza di grosse quantità di placca.

L'ambiente, la genetica e le abitudini di vita (il fumo, l'alimentazione, lo stress) possono cambiare l'espressione fenotipica e di conseguenza il lo sviluppo e il decorso della malattia.

È ormai nota anche la variabile "ospite" come un fattore coinvolto nell'eziologia delle malattie parodontali.

Il Modello di causa a componenti sufficienti (SCC) fu introdotto da Rothman nel 1976 [32] e viene definito anche modello a “torte causali” (Figura 6). È un approccio alla causalità multifattoriale della parodontite. Secondo questo modello, nessun singolo fattore produce la malattia, ma essa è causata dal risultato di molteplici cause che agiscono insieme. I singoli fattori causali sono rappresentati da singole fette di una torta intera, e una torta completa rappresenta l’insieme dei fattori causali che provocano la malattia e viene definita “causa sufficiente”. Non è comunque possibile individuare la comunicazione unica di fattori causali che causano la malattia, perché sono differenti in ogni individuo. Pertanto, i batteri della placca sono una causa necessaria ma non sufficiente se da soli a provocare la malattia; ci sono altre componenti che svolgono un ruolo causale nello sviluppo della Parodontite.

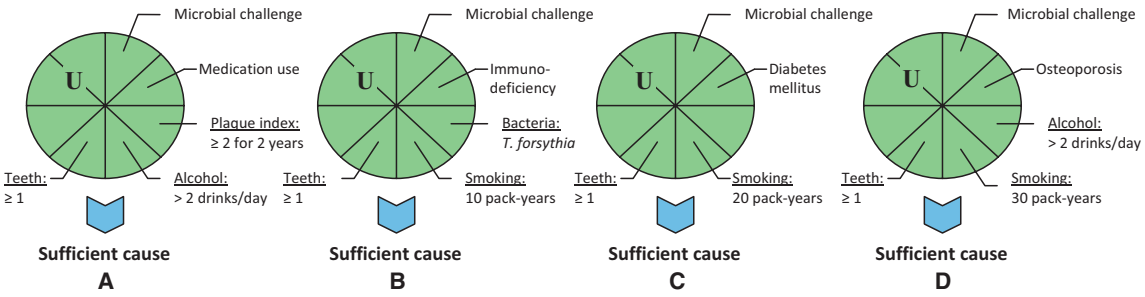


Figura 6. modello SCC

Tutte le cause sopra descritte sono un potenziale bersaglio terapeutico.

È possibile cercare di individuare tutti i fattori che hanno causano la malattia in quel soggetto e valutare i possibili interventi per cercare di bloccare l’insorgenza o limitare le conseguenze della malattia.

P.1.4 Ereditarietà

L'ereditarietà misura la proporzione della variazione fenotipica che può essere attribuita alla variazione genetica [33].

Nel contesto della salute orale, in un campione con simili abitudini di igiene orale domiciliare e fattori sociali e ambientali, l'ereditarietà sarà maggiore rispetto a un campione con forti variazioni nelle abitudini. Si stima che la Parodontite abbia un'ereditarietà del 50%.

Gli studiosi concludevano che la modalità ereditaria più probabile fosse la trasmissione autosomica dominante.

Le recenti scoperte ipotizzano che le localizzazioni genomiche di varianti di rischio siano all'interno di elementi regolatori di geni e regioni cromosomiche non previste.

Per la maggioranza, le varianti geniche, sono associate con oltre 400 malattie.

Per la parodontite, le varianti di rischio sono intronіche per ANARIL e GLT6D1, e giacciono varie kilobasi a monte e a valle delle proteine COX-2 e NPY.

GLT6D1 è considerato un gene associato al rischio di parodontite perché è espresso nella gengiva e nelle cellule T.

La proteina COX-2 converte l'acido arachidonico in prostaglandina H2, precursore della prostaglandina E2 (PGE2). Quest'ultima causa riassorbimento dell'osso alveolare.

Le prostaglandine sono un gruppo di mediatori fondamentali per l'infiammazione e la risposta dell'ospite.

NPY (Neuropeptide Y) si pensa controlli e possa alterare l'equilibrio tra cellule T helper di tipo 1 e 2, e che quindi sia uno dei responsabili dello spostamento verso la risposta Th2.

Recenti studi dimostrano che a essere ereditati non sono solo i geni, ma anche le informazioni che ne regolano l'espressione. Lo studio su "Science" da ricercatori del Max-Planck-Institut per l'immunobiologia e l'epigenetica a Friburgo, in Germania, ha raccolto prove importanti per affermare che le istruzioni epigenetiche sono trasmissibili [34]. Questa affermazione è un importante traguardo perché permette di comprendere quanto siano importanti le alterazioni dell'individuo in risposta all'ambiente che lo circonda e ai suoi comportamenti.

CAPITOLO 2

Meccanismi Epigenetici nei diversi tessuti

P.2.1 Meccanismi epigenetici di base

Il termine epigenetica risale al 1942 quando Conrad Waddington lo ha coniato definendolo come "branca della biologia che studia l'interazione tra i geni e i loro prodotti, portando alla manifestazione di un fenotipo" [35].

Alla fine del '900 il biologo Robin Holliday ampliava la definizione individuando due componenti epigenetiche: da una parte i cambiamenti dell'espressione genica, dall'altro l'ereditarietà che non dipende dalla sequenza di DNA. Quest'ultima definizione viene presa in considerazione quando si parla di modificazione degli istoni, imprinting, formazione dei centromeri o inattivazione del cromosoma X [36].

Oggi, per epigenetica si intendono quelle modificazioni che non intervengono direttamente sulla sequenza di DNA ma sulla sua struttura, che sono stabili e danno luogo a cambiamenti nella funzione e nell'espressione genica.

Il DNA è una doppia elica composta da una lunga sequenza di quattro basi azotate (A, T, C e G), che contiene l'informazione per tutte le funzioni del nostro corpo e si trova nel nucleo [37].

E' avvolto da proteine dette istoni dando origine ai nucleosomi fino alla formazione dei cromosomi. I cromosomi a loro volta sono costituiti da cromatina, materiale complesso composto da DNA e proteine a esso associato. L'organizzazione del cromosoma influenza l'espressione dei geni.

I geni inattivi sono associati alla cromatina altamente condensata chiamate *eterocromatina*. La maggior parte di DNA dell'eterocromatina non viene trascritto.

I geni attivi sono invece associati alla cromatina lassamente organizzata e filamentosa chiamata *eucromatina* che è in grado di interagire con i fattori di trascrizione e con proteine di regolazione [38].

Anche le modificazioni chimiche degli istoni cambiano la struttura della cromatina.

Alle code degli istoni (sequenza di amminoacidi) vengono attaccati gruppi metilici, acetilici, zuccheri e proteine che possono attivare o spegnere geni, esponendoli o nascondendoli.

La metilazione del DNA è la più frequente modificazione epigenetica e consiste nel legame di un gruppo metile in posizione 5 nell'anello della citosina dovuto all'enzima metiltransferasi.

Il rimodellamento della cromatina e metilazioni del DNA influenzano l'espressione genica [39].

Queste modificazioni si verificano in risposta alle influenze ambientali e possono modificare la suscettibilità alle malattie attraverso cambiamenti dell'epigenoma.

P.2.1.1 Epigenoma e Tessuti

Contrariamente al genoma, l'insieme di tutte le informazioni contenute nel DNA, che è lo stesso in tutte le cellule e per tutta la vita, l'epigenoma è dinamico e differisce tra cellule e tessuti [40].

Esso è alla base dei processi vitali e dello sviluppo embrionale, permette l'adattamento e la risposta all'ambiente. Inoltre, interviene nella regolazione delle funzioni metaboliche e cambia durante la vita in risposta ai cambiamenti nel microambiente cellulare e ai fattori ambientali.

Pertanto, le esposizioni ambientali hanno il potenziale per alterare l'espressione genica e modificare la suscettibilità alle malattie.

L'epigenetica nel campo della ricerca dentale è ancora alle prime fasi, ma sono emerse evidenze relative all'infiammazione e ai marker infiammatori, nonché segnalazioni sull'influenza dei fattori ambientali che incidono sulla salute orale.

È stata provata una differenza nel livello di metilazione del genoma tra un organo ed un altro dello stesso individuo. Un esempio è tra il pancreas e il timo.

Le malattie infiammatorie croniche, come la parodontite, hanno specifici tessuti bersaglio in cui l'infiammazione è persistente e causa distruzione tissutale.

Un paziente con parodontite può avere solo alcuni denti affetti da malattia e altri no.

Questo indica una diversa risposta ai batteri e / o una differenza nel microbiota dei diversi siti, suggerendo quindi un cambiamento locale nella regolazione dei geni associati all'infiammazione.

È stato dunque affermato che cambiamenti epigenetici si verificano localmente all'interfaccia biofilm-gengivale attorno ai denti e che le modifiche epigenetiche differiscono tra un sito infiammato di parodontite e siti non infiammati nello stesso individuo [41].

P.2.1.2 Pazienti con lo stesso fenotipo clinico rispondono in maniera diversa al trattamento

Studi che hanno analizzato i meccanismi epigenetici nei diversi tessuti hanno dimostrato che questi schemi differiscono anche quando i tessuti provengono dallo stesso paziente.

Un confronto tra tessuti gengivali e campioni di sangue periferico ha mostrato una differenza di livello di metilazione del promotore del gene interleuchina 6 (IL-6) che era minore nelle gengive rispetto al sangue [42].

La consapevolezza che l'epigenoma cambia tra un tessuto ed un altro è fondamentale quando si studiano questi fenomeni perché bisogna campionare il tessuto più adatto, disponibile e corrispondente alla malattia in studio.

L'epigenoma è diverso anche tra siti infiammati e non dello stesso individuo per la differenza nei livelli di metilazione associati ai percorsi di differenziamento cellulare, il numero di cellule che vanno in apoptosi, la presenza di Liposaccaride (LPS), la secrezione mediata, la possibilità di oncogenesi, l'adesione cellulare [43].

Questa conoscenza contribuisce a migliorare la comprensione e le motivazioni per cui alcuni pazienti con lo stesso fenotipo clinico, ovvero la presentazione clinica della malattia, rispondono in modo diverso al trattamento.

Poter correlare un pattern/marker epigenetico con un fenotipo clinico è interessante, come usare l'epigenetica per identificare i pazienti a rischio.

Le nuove classificazioni possono identificare meglio le persone sensibili e non sensibili al trattamento rispetto alle precedenti [44]. Dal 2017, la classificazione identifica gradi e stadi e sottolinea che l'unico elemento che può determinare lo stato infiammatorio è il Bop (Bleeding on Probing-indice di sanguinamento gengivale), ovvero il rapporto tra siti

sanguinanti e non, e che il rapporto tra indici di placca e sanguinamento possono determinare il fenotipo.

Nonostante il valore e l'importanza di questi parametri, molto spesso le tecniche diagnostiche impiegate sono incapaci di prevedere la risposta del paziente al trattamento. Una ragione è proprio il fenotipo clinico che può non riflettere i processi biologici sottostanti che si verificano nell'interfaccia biofilm-gengivale perché ci sono grandi prove di differenze significative tra individui che hanno presentazioni cliniche molto simili ma risposte al trattamento completamente diverse.

La risposta immunitaria dell'ospite sembra svolgere un ruolo importante nell'insorgenza e progressione della malattia. Si può anche ipotizzare che la malattia può essere associata a carenze nelle difese dell'ospite e ad un fenotipo iper-reattivo, con livelli locali e sistemici aumentati di mediatori infiammatori.

I fenotipi sono quindi determinati dal microbiota, dall'entità della risposta infiammatoria e immunitaria dell'ospite che è a sua volta guidata dal genoma e dall'epigenoma che rispondono alle varie esposizioni ambientali.

P.2.2 Ereditarietà delle modificazioni epigenetiche

La metilazione del DNA e la modificazione degli istoni sono processi che si conservano nel corso dell'evoluzione. È proprio grazie a questi meccanismi che si definisce l'identità cellulare durante lo sviluppo embrionale, e che questa viene trasmessa alle cellule figlie. Il differenziamento cellulare per ogni tessuto è fondamentale per la generazione di cellule e tessuti specializzati. Per mantenere la "memoria cellulare" alle successive generazioni

è importante l'impacchettamento dei nucleosomi, ovvero la struttura della cromatina, e la genetica.

In alcuni casi in cui è stabile, la struttura rimane tale per sempre e viene ereditata; in altri casi, la struttura rimane per il tempo necessario a determinare l'effetto dello stimolo ambientale.

La memoria cellulare ha comunque una base genetica.

Per quanto riguarda l'ereditarietà, bisogna chiarire se si parla di ereditarietà tra generazioni di cellule o tra generazioni di individui pluricellulari.

Il profilo di metilazione viene definito ereditabile dalla cellula figlia.

La metilazione di DNA consiste nell'aggiunta di un gruppo metile al residuo di citosina con conseguente formazione di metil-citosina. Il gruppo metile così posizionato impedisce il legame ai fattori di trascrizione. Infine, grazie all'enzima metiltransferasi, si riproduce lo stato di metilazione sul DNA stampo sul nuovo filamento.

Dopo la fecondazione, lo zigote va incontro a demetilazioni e man mano con il tempo vengono designati nuovi siti di metilazione.

Bisogna precisare che il profilo di metilazione viene trasmesso alle cellule figlie ma non ad un altro individuo. Ci sono comunque nuovi studi sui geni imprinted, che dimostrano che alcuni siti hanno profili di metilazione che vengono mantenuti nelle cellule figlie e nelle generazioni future. L'imprinting avviene quando l'espressione fenotipica di certi geni è determinata dal fatto che un certo allele sia stato ereditato dalla madre o dal padre. L'imprinting genomico è quindi considerato un esempio di fenomeno epigenetico [45].

Dal momento che la metilazione può essere trasmessa essa costituisce un meccanismo di ereditarietà epigenetica. Si pensa dunque che quest'ultimo possa essere un fondamentale meccanismo di regolazione durante la vita di un individuo.

Dato che la metilazione tende ad aumentare con l'età in alcuni individui e in altri tende a diminuire in risposta a stimoli ambientali si possono generare nuovi tratti fenotipici, senza modificazioni a livello delle sequenze nucleotidiche.

Oltre alla sequenza di DNA, esiste il cosiddetto "maternal cocktail" costituito di proteine, RNA e altre molecole che partecipano alle prime fasi embrionali e che sono trasmessi dalla madre al figlio. Questo è il risultato del genoma e dell'ambiente in cui essa vive.

Infine, un tema dibattuto è l'ereditarietà del codice istonico. Gli studi fino ad oggi sono stati dimostrati sugli animali, mentre sull'uomo sono stati trovati solo casi isolati.

CAPITOLO 3

Correlazione tra Epigenetica e Parodontite

P.3.1 Premessa: fattori ambientali

Nell'uomo, le modifiche del materiale genetico in risposta a fattori ambientali, possono predisporre e causare una maggior suscettibilità alle malattie. Le modificazioni epigenetiche possono verificarsi sia durante lo sviluppo embrionale che nel corso della vita.

Le alterazioni che si sviluppano nella vita intrauterina si pensa abbiano un impatto maggiore sull'organismo perché si verificano sulle cellule staminali embrionali, e possano portare a modificazione permanenti. Queste, possono essere determinate dal fenotipo della madre e dallo stile di vita che determina i fattori ambientali di esposizione.

I fattori ambientali che possono indurre modificazioni epigenetiche durante la vita adulta sono:

l'alimentazione, la composizione microbica nella cavità orale, il luogo e clima, caratteristiche socio-economiche, terapie farmacologiche, abitudini viziate come fumo, alcol e stress.

Oltre ai fattori ambientali, sono presenti anche fattori acquisiti o genetici [46].

I cambiamenti epigenetici sono necessari per mantenere lo stato di salute e per il normale sviluppo dell'organismo. Inoltre, controllano diverse funzioni come l'attivazione o il silenziamento di alcuni geni che però, in alcuni casi possono portare ad alcuni stati patologici.

Quando una malattia ha cause multifattoriali, è probabile che possa essere correlata a modifiche a livello epigenetico.

La Parodontite, è una malattia complessa con eziologia multifattoriale e si pensa essere associata ad alterazioni dell'epigenoma.

P.3.2 Ultime ricerche sull'Epigenetica

Negli ultimi tempi la ricerca genetica ha scoperto i fattori chiave che legano il DNA e lo organizzano in unità funzionali [47].

È importante precisare che ogni proteina nel nucleosoma è soggetta a modifiche post-traduzionali, che appaiono in posizioni definite del genoma, ed è fortemente correlata con le attività osservate nel DNA come l'attività trascrizionale. Ad esempio, la trimetilazione dell'istone H3 lisina 4 (H3K4me3) è associata all'attivazione trascrizionale, mentre H3K9me3 e H3K27me3 sono associati alla repressione trascrizionale (Figura 1.) [48] .

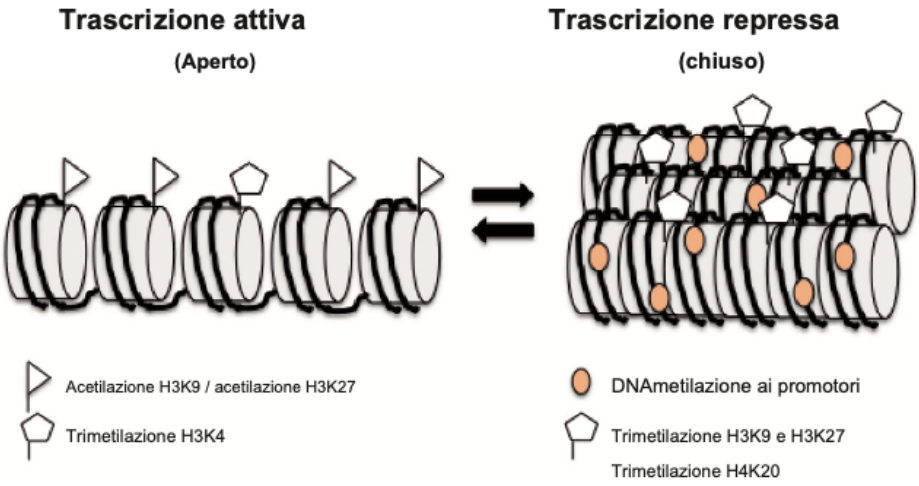


Fig.1. La cromatina cambia a causa di modificazioni epigenetiche e stato trascrizionale. Panoramica schematica dei cambiamenti della cromatina in base alle tipiche modifiche epigenetiche. Combinazioni di

modificazioni epigenetiche contribuiscono a determinare la struttura della cromatina, portando a una configurazione della cromatina aperta o chiusa e allo stato trascrizionale. Ad esempio, ridotta metilazione del DNA al promotore dell'interferone gamma (IFNG) è associato ad una maggiore espressione di IFNG nei tessuti infiammati di pazienti con parodontite, rispetto ai tessuti parodontali sani.

La modificazione epigenetica più frequente è la metilazione del DNA, che si verifica al 5° carbonio delle citosine (5mC), più comunemente vicino a una guanosina (CpG).

I gruppi metilici sono collocati dalle metiltransferasi del DNA (DNMT) che catalizzano il trasferimento dal donatore di metile S-adenosil metionina alle citosine.

La metilazione in siti precedentemente non metilati viene effettuata dal DNMT3a / b, mentre è mantenuta dal DNMT1. Insieme permettono la metilazione del genoma in ogni momento, lasciando solo metilati elementi regolatori come promotori, potenziatori e isole ricche di CpG [49].

L'acquisizione della metilazione del DNA nel promotore è principalmente associata al silenziamento genico (Figura 1). La metilazione del DNA può essere modificata anche mediante ossidazione dalle proteine TET, implicate nei processi di demetilazione del DNA tramite il meccanismo di riparazione dell'escissione di base [50].

Queste, sono una famiglia di proteine che aiutano a regolare l'attività dei geni influenzando l'architettura cromosomica. Inoltre, identificano un gene delle cellule B.

È dunque facile pensare che le modifiche fuori luogo e la ridotta dinamica della loro distribuzione portino ad attività genetica alterata e malattia (figura 2). Ciò comunemente avviene a seguito di mutazioni di fattori che causano o influenzano direttamente le modificazioni epigenetiche [51].

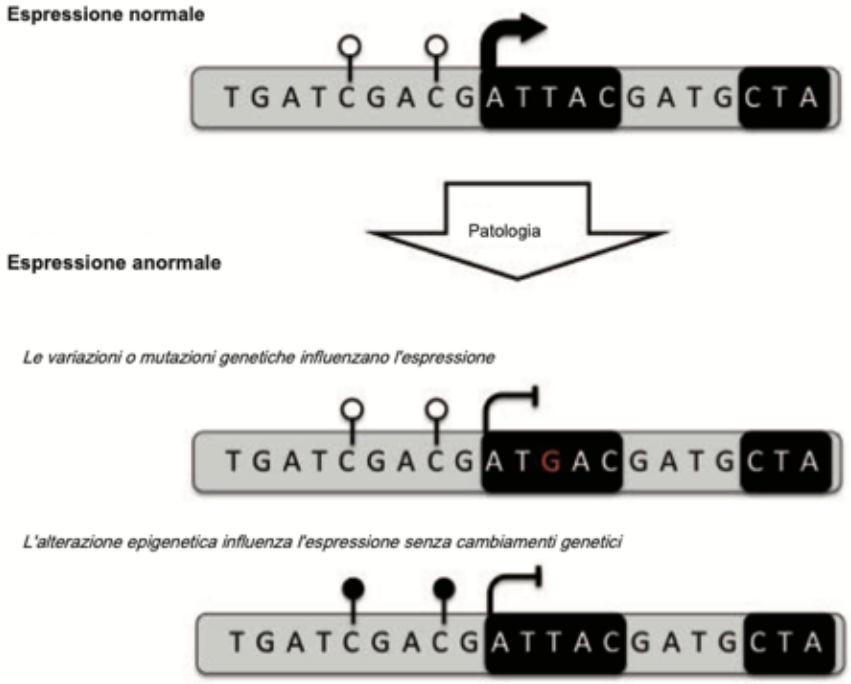


Figura 2. Alterazioni genetiche ed epigenetiche nella progressione della malattia. L'espressione normale può essere alterata mediante la produzione di proteine anomale o un'alterata efficienza della trascrizione genica. Allo stesso modo, l'interruzione può essere ottenuta mediante alterazioni epigenetiche nelle regioni di regolazione trascrizionale. La "scatola nera" rappresenta gli esoni mentre la "scatola grigia" rappresenta gli introni. La "G evidenziata" rappresenta un nucleotide che ha sostituito un nucleotide dominante o normale come variazione o mutazione genetica, rispettivamente. I cerchi bianchi e neri indicano i diversi stati delle modifiche epigenetiche agli elementi regolatori di un dato gene.

Il posizionamento delle modificazioni epigenetiche è strettamente controllato.

Ogni tessuto ha un profilo epigenetico unico e i cambiamenti si verificano a seguito di processi di sviluppo e rigenerativi. Vi sono prove che le cellule staminali embrionali hanno un modello epigenetico unico che cambia in base a segnali di differenziamento come fattori estrinseci e ormoni [52] [53].

Il modello epigenetico che osserviamo in un particolare tessuto in un determinato momento nel tempo è un riflesso della sua attività [54].

La maggior parte delle informazioni viene quindi riflessa nel suo modello di espressione genica.

Per questo, il modello epigenetico osservato può essere usato per capire la condizione trascrizionale della cellula o del tessuto.

P.3.3 Isole CpG e geni coinvolti

Le isole CpG sono piccole regioni di DNA ricche di CG, lunghe 1-2 Kilobasi.

Nel genoma sono presenti tante isole sparse e di solito la mancanza di CpG è causata da metilazioni che avvengono sulle citosine. I geni sono per la maggior parte localizzati vicino alle isole e lo stato di metilazione dell'isola riflette il profilo di espressione del gene adiacente. In sintesi, metilazioni differenti in siti CpG tra soggetti parodontali e non, suggerisce che i cambiamenti epigenetici possono aiutare a spiegare la variazione della suscettibilità alla parodontite.

Studi su gemelli hanno mostrato che la composizione genetica è un fattore di rischio per la parodontite perché è stato dimostrato un diverso schema microbico sulla parodontite aggressiva anche in individui geneticamente identici con la stessa esposizione ambientale.

Si può affermare che la possibile spiegazione delle differenze riguardi anche le modifiche epigenetiche [55].

In uno studio condotto da Kurushima et al., sono stati identificati specifici cambiamenti di metilazione del DNA legati alla malattia parodontale.

Si può affermare che i geni che ospitano varianti genetiche associate alla parodontite sono correlati alla risposta infiammatoria e al riassorbimento osseo alveolare [56].

I segni epigenetici possono cambiare in risposta a stimoli cellulari e ambientali nel contesto della suscettibilità alle malattie.

La maggior parte della ricerca epigenetica correlata alla parodontite finora si è concentrata sui geni candidati in campioni caso-controllo [57] [58]: studi utilizzati per malattie croniche e per valutare uno o più fattori di rischio nell'eziopatogenesi di una malattia, per valutare la stima del rischio relativo (RR) attraverso il calcolo dell'odds ratio (OR) e nella valutazione dei singoli fattori e della loro relazione.

Sono presenti due gruppi di soggetti: i malati (i casi) e i soggetti con le stesse caratteristiche dei primi ma senza la manifestazione della malattia (i controlli). L'attendibilità e l'affidabilità dello studio dipende dalla corretta selezione dei casi e dei controlli [59].

Studi precedenti, hanno condotto l'ipotesi che la regolazione epigenetica media l'infiammazione gengivale nel tessuto epiteliale modificando la funzione de geni delle citochine.

Ciò include la up-regulation delle citochine proinfiammatorie e la down-regulation delle citochine antinfiammatorie per attivare una risposta completa.

Come indicatori di malattia sono stati utilizzati sanguinamento gengivale, storie di malattie gengivali o mobilità dentale.

È stato utilizzato un duplice approccio: inizialmente è stata valutata l'associazione dei tratti parodontali con variazioni a livello dell'epigenoma in più di 500 femmine gemelle. Successivamente, è stato intrapreso uno studio di associazione genoma-wide (GWAS).

L'associazione tra stato parodontale e livelli di metilazione del DNA è stata valutata nel sangue intero, nel tessuto adiposo e nel tessuto buccale e i profili di metilazione del DNA

sono stati generati utilizzando il Kit BeadChip Infinitium Human Methylation450 (Illumina Inc., San Diego, CA,USA).

Sono stati identificati 37 geni candidati per la parodontite (Tabella 1).

Alcuni di questi, sono stati selezionati in quanto precedentemente identificati attraverso studi di associazione genoma-wide (GWAS), mentre altri grazie alla loro funzione biologica e di ricerche precedenti. In totale, 28 dei 37 geni candidati erano rappresentati sul Kit BeadChip Infinitium Human Methylation450 e 247 siti CpG hanno superato la valutazione del controllo di qualità nel sangue.

Successivamente, è stato eseguito un modello di regressione lineare a effetto misto (LMER) per valutare l'associazione tra livelli di metilazione del DNA a ciascuna sonda del Kit BeadChip Infinitium Human Methylation450.

Inizialmente, i livelli di metilazione erano la variabile di risposta e ogni fenotipo era un predittore di effetti fissi, insieme a un numero di covariate.

Queste includevano gli effetti fissi (età, Beadchip e sua posizione, BMI, abitudine al fumo, composizione delle cellule del sangue, anno di estrazione del DNA e differenza di tempo tra il momento di raccolta del fenotipo dentale e l'estrazione del DNA).

Successivamente il fenotipo dentale è stato escluso come variabile predittiva.

Dopodichè, è stato testato se i livelli di espressione dell'esone erano associati in modo differenziale ai tratti parodontali utilizzando un modello di regressione lineare a effetti misti.

La variazione fenotipica è stata divisa in tre componenti: fattori genetici additivi, fattori ambientali condivisi (esposizioni familiari condivise da entrambi i gemelli), fattori ambientali unici (esposizioni specifiche per ogni singolo individuo) [60].

Simbolo del gene [un]	Sonde da 450 K. [b]	SNP	Associazione funzionale con parodontite o altre malattie	Riferimenti
NIN	2	rs12883458	Associazione significativa a livello di genoma con parodontite cronica grave	Rhodin et al. [1]
ABHD12B	2	rs12883458		
WHAMM	9	rs2890313		
KCNK1	0	rs11800854	Associazione significativa a livello di genoma con colonizzazione elevata del complesso rosso	
DAB2IP	0	rs10760187	Associazione significativa a livello di genoma con Porphyromonas gingivalis alta colonizzazione	
CLEC19A	1	rs1156327	Associazione significativa a livello di genoma con PCT1 (struttura della comunità microbica che ha un'alta correlazione e un carico positivo con tutti i patogeni)	Offenbacher et al. [2]
TRA	0	rs3811273		
TM9SF2P	1	rs9557237		
GGTA2P	0	rs17184007		
IFI16	1	rs1633266		
RBMS3	0	rs17718700		
C1QTNF7	0	rs4074082	Associazione significativa a livello di genoma con PCT3 (alto carico positivo di GCF-IL-1 β e Aggregatibacter actinomycetemcomitans)	
TSNARE	1	rs9772881		
HPVC1	0	rs10232172	Associazione significativa a livello di genoma con PCT4 (comunità di infezione mista con alto carico positivo di GCF-IL1, debole carico positivo di Pn, Pi, e Td, e bassi livelli di Aa)	
SLC15A4	1	rs7135417	Associazione significativa a livello di genoma con PCT5 (parodontite cronica)	
PKP2	2	rs6488099		
SNRPN	9	rs904310		
IL8	3		Regolazione della risposta immunitaria innata e acquisita Aumento del liquido crevicolare gengivale da pazienti con parodontite	Zhan et al. [11]
CD44	34		Distruzione del tessuto parodontale indotta dal fumo	
CXCL1	7		Stimolazione del lipopolisaccaride nei fibroblasti orali che porta allo sviluppo di infiammazione parodontale	
IL6ST	17		Trasduttore di segnale per la famiglia delle interleuchine; regola gli osteoclasti e l'omeostasi del calcio	
CCR1	11		Innesco del processo di riassorbimento osseo Difesa innata dell'ospite nei tessuti parodontali Immunoreattività nel fluido	
MMP7	7		crevicolare gengivale Rimodellamento tissutale fisiologico del tessuto parodontale Ruolo protettivo contro la perdita di	
MMP13	10		osso alveolare in assenza di Porphyromonas gingivalis	
MMP3	12			
TLR9	0			
IL18	15		Infiammazione e modulazione dell'attività di macrofagi e neutrofili. Significativamente più alto nei pazienti con parodontite cronica rispetto ai controlli sani	
IFNB1	0		Il TNFa, attraverso l'azione autocrina di IFNbeta, regola in modo differenziale l'espressione dei geni proinfiammatori e la sintesi del DNA	
GLT6D1	2	rs1537415	Associazione significativa a livello di genoma con parodontite aggressiva	Schaefer et al. [12]
IL1B	8		Il tasso di trasporto dell'allele R (frequenza dei genotipi N / R e R / R) tra casi e controlli	Laine et al. [13]
IL1RN	13			
IL6	14			
IL10	7			
VDR	23			
CD14	29			
TLR4	4			
MMP1	11			

[un] I nomi dei geni in grassetto non sono stati utilizzati nell'analisi perché non erano ben rappresentati nell'array Infinium HumanMethylation450k

[b] Numero di sonde annotate per mappare ogni gene nell'array Infinium HumanMethylation450k

tabella 1. Loci GWAS parodontite cronica e geni candidati da studi precedenti

I risultati di questo studio identificano un sito CpG associato al sanguinamento gengivale che si trova all'interno del 5' UTR di ZNF804A. Questo sito era significativamente ipo-metilato nei candidati con sanguinamento gengivale.

Successivamente è stato correlato il livello di metilazione del sito CpG più associato in questo gene con 271 metaboliti del sangue in pazienti a digiuno[61].

Degli 8 metaboliti che sono stati trovati associati a ZNF804A, il segnale più forte è stato osservato per l'ornitina che è associata alla mobilità dei denti.

Sono stati poi identificati 58 siti CpG associati alla mobilità dei denti. I due siti più associati si trovavano nel corpo genico di IQCE e XKR6.

Inoltre, è interessante notare che dei fattori ambientale comuni cioè condivisi da più soggetti è stata identificata in 12 dei 58 siti CpG.

Successivamente, è stato osservato che nel sangue, 26 siti CpG (mobilità dei denti) e 15 siti CpG (sanguinamento gengivale) erano associati a fenotipi dentali e i siti CpG associati ad entrambi i tratti parodontali sono stati mappati su 8 geni (VDR, IL6ST, TMCO6, IL1RN, CD44, IL1B, WHAMM e CXCL1).

Nel tessuto buccale, è stato riscontrato un valore ancora più alto rispetto a quello del sangue (Fig. 3 b): 51 siti per mobilità dei denti e 38 per sanguinamento gengivale erano associati a fenotipi dentali e i siti associati a entrambi i tratti parodontali erano mappati su 16 geni (che comprendevano gli 8 geni mappati sul sangue).

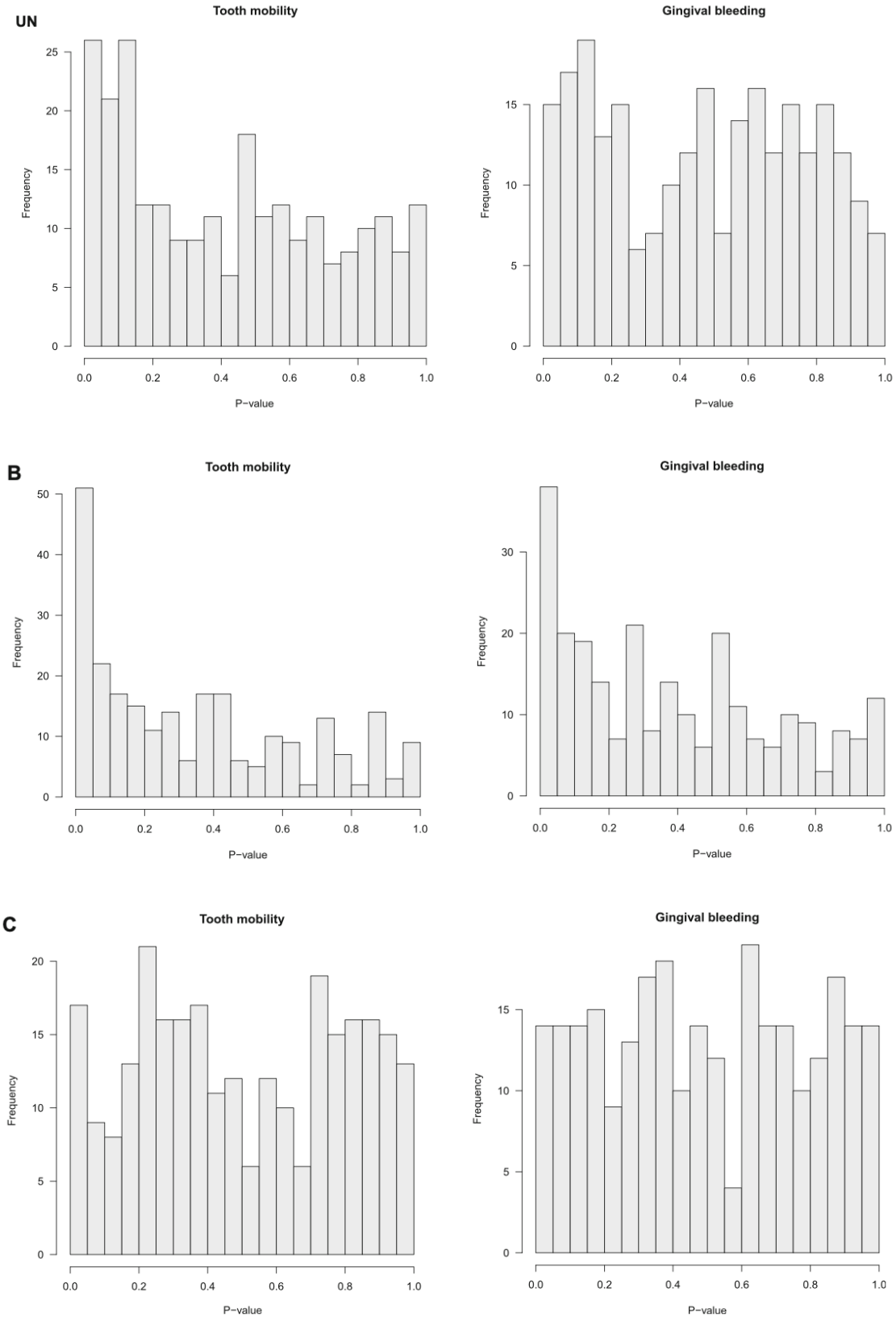


Fig. 3 Prova dell'associazione metilazione-fenotipo nelle regioni candidate per la parodontite cronica in tre

tessuti. Gli istogrammi mostrano la forza dell'associazione tra i livelli di metilazione nel sangue (un), buccale (b), e adiposo (c) tessuti nei siti CpG mappati in 28 regioni candidate per i tratti parodontali.

Degli 8 geni, in 2 geni (WHAMM e TMCO6) è stata studiata l'associazione tra i livelli di metilazione dei siti CpG associati al fenotipo e i profili dei metaboliti del sangue.

Associazioni significative sono state trovate in 48 metaboliti, soprattutto correlata ai lipidi.

Infine, i risultati identificano la metilazione differenziale in specifici siti CpG tra individui con tratti parodontali postivi e negativi, ciò suggerisce che i cambiamenti epigenetici possono aiutare a spiegare la variazione della suscettibilità alla parodontite cronica.

Si afferma la rilevazione dell'ipo-metilazione nel 5 ′ UTR di ZNF804A e corrispondente upregolazione dell'espressione genica in soggetti che soffrono di sanguinamento gengivale, di conseguenza ZNF804A dovrebbe essere considerato come un gene correlato all'infiammazione gengivale.

Si conferma che ornitina svolge un ruolo importante e che Streptococcus gordonii e Fusobacterium nucleatum esprimono arginina e ornitina.

I risultati suggeriscono una potenziale sequenza di eventi nella malattia parodontale in stadio iniziale che può portare alla sua progressione.

Negli stadi più gravi sono stati identificati 58 siti CpG con segnali a livello dell'epigenoma, tra cui il più fortemente associato per questo fenotipo era nel gene IQCE che si presentava ipermetilato in soggetti con mobilità dentale.

Questi dati confermano anche che i livelli di metilazione del DNA possono essere sotto controllo genetico [62].

Infine, 8 geni mostravano associazioni di metilazioni con entrambi i tratti parodontali nel sangue e nei tessuti buccali. Di questi, WHAMM e TMCO6 sono ottimi candidati per far luce sulle modificazioni epigenetiche nel corso della malattia [63].

Gli studi di Barros & Offenbacher forniscono dati che mostrano più isole metilate di CpG nel tessuto gengivale cronicamente infiammato.

Gli studiosi mostrano l'evidenza che l'infezione cronica e l'infiammazione possano indurre alterazioni epigenetiche su geni dei tessuti parodontali.

Gli effetti epigenetici possono essere anche la base per le associazioni tra parodontite e tumori o lesioni precancerose orali [64].

Di recente, Zhang et al. hanno mostrato che il promotore del TNFA è stato ipermetilato in due siti CpG, con conseguente riduzione dell'espressione. Invertendo la metilazione mediante trattamento con un agente demetilante in vitro, si è mostrata una maggiore espressione del TNFA, indicando che la metilazione regolava effettivamente l'espressione [65].

In uno studio con campioni di tessuto gengivale senza infiammazione di pazienti parodontali e sani, si dimostra che le isole Cpg intrageniche nel gene SOCS1 sono state trovate ipermetilate nel tessuto malato rispetto al tessuto sano.

La ricerca suggerisce che le cellule epiteliali orali hanno un'epigenoma diverso quando presenti in un ambiente infiammatorio rispetto alle cellule in un ambiente non infiammato.

Analizzando le metilazioni dei siti CpG in 22 geni infiammatori è stato trovato un livello di metilazione diminuita nelle regioni dei promotori dei geni IL-17C e CCL-25 nei

pazienti con parodontite che indicano un aumento dell'espressione genica. I livelli riscontrati, erano simili a quelli ottenuti da Barros e Offenbacher.

Le citochine IL-17C e CCL-25 hanno un importante ruolo nella risposta immunitaria delle cellule TH. I cambiamenti nel loro livello di metilazione può causare un aumento di perdita di attacco parodontale [66].

Uno studio si è concentrato sui geni MTHFR e DNMT che sono coinvolti nei processi di metilazione del DNA ed entrambi, i polimorfismi e la metilazione di questi geni sono coinvolti nelle malattie infiammatorie [67] [68]. Anche SOD e CAT, geni correlati allo stress ossidativo, sono stati associati alla parodontite.

Le alterazioni del profilo di metilazione del DNA sono state trovate nei geni del recettore Toll-like, delle citochine e delle metalloproteinasi [69] [70].

I microRNA, controllano l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Circa il 50% dei geni per microRNA sono associati alle isole CpG [71].

Le alterazioni epigenetiche si estendono nel sangue e nell'epitelio buccale, oltre che nella gengiva.

L'espressione dei microRNA e delle proteine antiossidanti, come la superossido dismutasi e la catalasi, sono alterate nelle cellule del tessuto gengivale e nella saliva dei pazienti con parodontite [72] [73].

I geni dei microRNA sono coinvolti nelle malattie infiammatorie, in particolare la famiglia miR-9 regola i trascritti delle citochine infiammatorie.

Lo studio è stato condotto su un campione di 100 soggetti non fumatori, generalmente sani, e divisi in un gruppo di controllo e uno di parodontite cronica.

È stato raccolto ed estratto il DNA dalla mucosa buccale ed è stata condotta l'analisi dei polimorfismi di MTHFR e DNMT3B e dei promotori del gene MTHFR, miR-9-1 e miR-9-3, e SOD1 e CAT.

I dati riportano che per DNMT3B, l'allele T era più frequente nella parodontite rispetto al gruppo di controllo. Allo stesso modo il genotipo TT, era più frequente nella parodontite rispetto al gruppo di controllo. Gli individui con il genotipo TT hanno circa quattro volte più probabilità di sviluppare la parodontite.

Per miR-9-1, la metilazione si è verificata nel 100% dei pazienti con parodontite ma solo nel 77,5% dei partecipanti al gruppo di controllo.

Per CAT, sebbene non sia stata osservata alcuna differenza significativa tra i due gruppi, c'era una tendenza alla metilazione nel gruppo della parodontite.

In base ai risultati, il genotipo TT potrebbe portare a ipermetilazione e ulteriore silenziamento di importanti geni correlati alla protezione contro la parodontite.

Inoltre, sono state rilevate riduzioni del livello di catalasi nella saliva di soggetti con parodontite rispetto a soggetti sani [74].

Secondo Punj, et al. [75] l'ipermetilazione di CAT si è verificata a causa dei ROS.

I patogeni parodontali attivano le difese dell'ospite, e a loro volta contribuiscono a contrastare i microrganismi. Tuttavia, l'esposizione prolungata ai ROS può indurre diverse reazioni patologiche nel tessuto dell'ospite, come lisi della membrana, frammentazione nucleare e attivazione o inattivazione enzimatica. È probabile che questi cambiamenti abbiano un ruolo nella patogenesi di molte malattie infiammatorie, come la parodontite [76].

Lo studio riportato da Schaefer et al. su tutto il genoma di un paziente con parodontite aggressiva hanno evidenziato l'associazione di rs1537415, situato nel gene glicosiltrasferasi (GLT6D1), con parodontite aggressiva.

Più recentemente, Sanders et al. hanno riportato una significativa associazione di un polimorfismo a carico di un RNA non codificante TSNAX-DISC1 relativamente raro (rs149133391) con parodontite cronica tra ispanici / latinoamericani e successivamente replicato tra un campione indipendente di afro-americani.

In un recente studio di Hong et al. hanno segnalato TENM2 (ODZ2) come associato alla parodontite cronica, mentre un precedente studio di associazione su tutto il genoma condotto da Divaris et al. ha evidenziato questo locus per la sua associazione con Aggregatibacter actinomycetemcomitans.

Anche i polimorfismi della defensina alfa 1 e alfa 3 (DEFA1A3) (rs2978951 e rs2738058) sono stati segnalati sia da un recente studio, che da uno studio di parodontite cronica precedente.

NPY è stato identificato come il più forte locus in associazione con parodontite aggressiva in soggetti maschi tedeschi.

In uno studio su tutto il genoma, 6 geni hanno mostrato prove di associazione a livello del genoma, 4 con parodontite grave e 2 con elevata colonizzazione patogena [77].

Grazie ad uno studio su tutto il genoma (GWAS) sono stati identificati nuovi geni associati alla suscettibilità, tra cui GLT6D1 nella parodontite aggressiva che era già stato identificato precedentemente (Schaefer et al.), NIN, NPY e WNT5A nella parodontite cronica grave e NCR2 e EMR1 nella parodontite cronica moderata.

Anche se non si conosce ancora il modo in cui i geni influenzano la patogenesi, il GWAS ha portato altre informazioni, rispetto ai precedenti studi adottati.

La tecnologia di microarray sembra essere efficace per identificare i geni ipermetilati e ipometilati associati all'infezione parodontale [78].

P.3.4 Polimorfismi

Per polimorfismo si intende la presenza, nella popolazione di una specie, di più alleli di uno stesso gene: per convenienza, si considerano solo le forme che si presentano con una frequenza maggiore dell'1%. I polimorfismi genetici possono essere dovuti alla mutazione, all'inserzione o alla delezione di più tratti più o meno lunghi della sequenza di DNA, fino all'estremo del cambiamento di un singolo nucleotide, che può modificare l'amminoacido prodotto di un singolo codone. Le frequenze dei polimorfismi genetici all'interno di una popolazione sono controllate da diversi fattori. Oltre al polimorfismo genetico, esiste il non genetico (o fenotipico), dovuto a fattori ambientali come il polimorfismo stagionale, sociale o coloniale. Alcuni polimorfismi genetici sono stati associati alla Parodontite, nonostante la malattia sia considerata multifattoriale, quindi a causa di una combinazione di fattori genetici e fattori ambientali (igiene orale, fumo di sigaretta, dieta, stress, ecc.).

Particolare attenzione deve essere posta ai fattori genetici, compreso il ruolo dei polimorfismi dei geni che codificano la produzione di mediatori infiammatori (Schenkein 2002) [79].

P.3.4.1 Geni e polimorfismi che coinvolgono interleuchine e citochine pro infiammatorie

Una specifica risposta infiammatoria provoca la sovraregolazione dei geni associati alla produzione di lectine che ricoprono le superfici delle cellule epiteliali, con la funzione di reclutare neutrofili nel sito di infezione. Ciò comporta l'attivazione di una risposta immunitaria innata e adattativa.

È in questa fase che la regolazione epigenetica dei modelli di espressione genica sembra svolgere il ruolo più importante ed è la chiave per l'upregolazione e downregolazione delle citochine proinfiammatorie e altre molecole di segnalazione per attivare una risposta immunitaria completa [80 81].

La ricerca si è concentrata principalmente sui geni che modulano la risposta infiammatoria, ovvero i geni che codificano per citochine, recettori della superficie cellulare, chemochine, enzimi e proteine correlati al riconoscimento dell'antigene.

Uno studio ha trovato tre polimorfismi genetici che si presentano più frequentemente associati alla parodontite cronica in diverse popolazioni, soprattutto negli italiani.

La prova ottenuta è stata per gli alleli dei geni IL-6, IL-10, e VDR.

Poiché il riassorbimento dell'osso alveolare è un fattore chiave nella Parodontite, il recettore della vitamina D (VDR) può contribuire alla suscettibilità della malattia[82 83 84].

I polimorfismi che codificano per IL-1 (una famiglia di più di 10 molecole) sono i più importanti (Greenstein e Hart 2002).

IL-1 aumenta la produzione di molecole di adesione, facilita la migrazione dei leucociti, stimola la produzione di MMP, attiva linfociti T e B, stimola gli osteoblasti e limita le

capacità rigenerative delle cellule causando la morte delle cellule deputate alla produzione di matrice extracellulare (Graves e Cochran 2003).

IL-1 alfa e IL-1 beta sono codificati dai geni IL-1 A e IL-1 B e sembrano essere associati all'infiammazione parodontale perché marker di suscettibilità per la parodontite.

Yin et al., in una meta-analisi, dimostra la correlazione significativa dell'allele T dell'IL-1 alfa con un maggior rischio di parodontite.

Dallo studio emerge anche che i fattori geografici ed etnici possono influire sulla presenza dei polimorfismi che varia a seconda della popolazione.

Per questo, è difficile o quasi impossibile valutare globalmente i polimorfismi a singolo nucleotide anche se grazie alle nuove tecniche di meta-analisi e studi di associazione su tutto il genoma ci sia maggior luce sul legame [85].

Il fluido crevicolare è facilmente ottenibile ed è stato usato come marker di infiammazione del tessuto parodontale nello studio di Lindroth et al.

Il fluido viene modificato dalla risposta locale dell'ospite al microbioma subgengivale e può fungere da biomarcatore nell'attivazione microbica della risposta immunitaria dell'ospite.

Ad oggi, l'espressione dell'interleuchina 1-beta del fluido crevicolare gengivale è un fenotipo infiammatorio specifico della parodontite per il quale esistono prove di un'associazione a livello del genoma. L'interleuchina 1-beta è considerata come un importante marcatore dell'infiammazione grave, perdita ossea e progressione della malattia.

Nello studio svolto, le varianti del locus IL-37 (indicatore di riferimento: rs3811046) hanno fortemente controllato l'espressione dell'interleuchina 1 beta nel fluido crevicolare.

In sintesi, la conclusione dello studio riporta che IL-37 potrebbe essere riconosciuto come un soppressore naturale della risposta infiammatoria e immunitaria [86].

Un ulteriore studio dimostra che alcuni polimorfismi a singolo nucleotide (SNP), che sono differenze di una singola "lettera" nelle sequenze di DNA riscontrate ogni poche centinaia di basi quando si confrontano genomi di individui in grandi popolazioni [87], alterano l'espressione genica e possono influenzare la risposta dell'ospite:

recettore Fc-γ (FCGR2A), IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18, fattore di necrosi tumorale alfa (TNFA), recettore della Vit D, matrice metalloproteinasi-1, Toll-like receptor-2 (TLR-2), TRL-4, e ciclo-ossigenasi-2 (COX-2) [88].

I geni delle citochine sembrano essere il bersaglio di eventi epigenetici multipli tra cui l'attivazione trascrizionale attraverso la perdita della metilazione del DNA e le modifiche attive dell'istone agli elementi regolatori.

Altri studi confermano che i geni IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 possono essere regolati da meccanismi epigenetici [89].

Nella cavità orale, la risposta infiammatoria comporta una sovraregolazione dei fattori di trascrizione (ad es. NF-κB e STAT) e cambiamenti epigenetici della cromatina simili ad altre malattie infiammatorie. I pazienti con parodontite cronica hanno mostrato sovra-espressione di citochine come IL-6 e IFN-γ nei loro tessuti infiammati.

I cambiamenti di espressione di alcuni loci avvengono per la perdita di metilazione presso i loro promotori [90].

Uno studio ha riportato che il genotipo del gene NF-κB1 era associato a parodontite aggressiva. Questo gene è attivo nei siti di infiammazione e può indurre la trascrizione di citochine pro-infiammatorie (TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8), chemochine, molecole di adesione e metalloproteinasi di matrice. Inoltre, alcune citochine possono attivare direttamente la via NF-κB.

Quest'ultimo può anche agire come fattore antinfiammatorio e ha un ruolo nell'espressione genica dell'IL-10.

L'IL-10 inibisce la sintesi di citochine pro-infiammatorie come IL-1, -2, -6 e stimola la produzione di anticorpi protettivi. Un elevato numero di polimorfismi sono stati trovati nel gene IL-10; tuttavia, le prove per la sua associazione sono contrastanti.

I genotipi AA in IL-10 sono stati associati all'aumento della suscettibilità di Parodontite cronica e aggressiva.

L'espressione di IL-6 è maggiore nei fluidi crevicolari gengivali e nei tessuti gengivali di soggetti con parodontite, ed è anche un potente stimolatore della differenziazione degli osteoclasti, del riassorbimento osseo e un inibitore della formazione ossea. Nel gene IL-6, sono presenti più di quattro polimorfismi al promotore. Tuttavia, la frequenza di molti alleli genici varia tra i gruppi etnici e numerosi studi hanno trovato risultati contraddittori riguardo alla relazione tra questo gene e la parodontite.

Per l'IL-6 il genotipo GG e l'allele G sembrano essere associati ad un aumento della suscettibilità della Parodontite aggressiva.

Simili a questi risultati, Nibali et al. ha rilevato l'allele 174 G è associato ad un aumento della Parodontite aggressiva.

In conclusione, possiamo affermare che la variazione allelica dei geni delle citochine provoca differenze fenotipiche nella risposta delle stesse [91].

Un altro studio conferma di aver trovato il promotore dell'IL-6 parzialmente metilato in campioni di tessuto gengivale sia in pazienti sani che malati, ma la sua espressione era maggiore nei pazienti con parodontite [92].

Shi et al., tramite l'utilizzo del sequenziamento di nuova generazione (NGS), hanno osservato una significativa associazione tra parodontite aggressiva e otto polimorfismi mitocondriali: "8860G-10400C" (OR = 2.828, p = .002), "8701A" (OR = 2.308, p = .005), "12705C-10398A" (OR = 2.683, p = .002), "9540C" (OR = 3.838, p = .001) e "10873T-15043G" (OR = 4.375, p = .001) [93].

P.3.5 Enzimi e Proteine

Ulteriori prove sui cambiamenti epigenetici associate alla parodontite riguardano un enzima che regola la produzione di prostaglandine che promuove infiammazione e dolore. Dagli studi è stato riportato che gli inibitori della COX-2 hanno ridotto i sintomi in pazienti parodontali [94]. Inoltre, l'espressione di COX-2 nei pazienti parodontali infiammati era inferiore e il suo promotore era ipermetilato [95] [96].

La malattia parodontale cronica è stata anche associata a modifiche di metilazione di E-caderina, una proteina adesiva che tiene unite le cellule vicine [97].

P.3.6 Fumo, diabete, alimentazione e stress

Possono verificarsi cambiamenti dinamici nella modulazione epigenetica durante la vita di un individuo che conferiscono plasticità fenotipica in risposta a fattori come la dieta, l'invecchiamento e le tossine.

È noto che il fumo di sigaretta induce ipometilazione globale ed è associata allo sviluppo del carcinoma della testa e del collo a cellule squamose.

L'associazione del fumo alla parodontite è stata ampliamente dimostrata sin dal 1946 (Pindborg JJ.) e nel 1983 con il primo studio Nazionale sullo stato Nutrizionale e la Salute svolto negli USA (NHANES I).

I dati mostrano che il fumo di tabacco modifica sia la risposta locale che sistemica dell'ospite.

La modifica è caratterizzata da una forte risposta infiammatoria, con livelli aumentati di citochine, specie reattive dell'ossigeno e collagenasi che sappiamo possono scatenare eventi epigenetici.

Il fumo inoltre, ha effetti negativi anche su malattie croniche come artrite reumatoide, sclerosi multipla, malattie cardiovascolari e infiammatorie intestinali [98].

Anche il diabete è stato collegato alla modulazione epigenetica.

L'obesità, il diabete e la sindrome metabolica contribuiscono sia all'infiammazione che alle malattie croniche. Il collegamento tra parodontite e queste patologie croniche e infiammatorie è documentato da diversi studi (Bullon et al., Linden et al.).

Anche in questo caso, uno stato infiammatorio cronico può causare modifiche epigenetiche.

Il risultato di alcuni studi mostra un'eccessiva reazione allo stress in alcuni ratti a seguito dell'esposizione a una sostanza, causata dalla trasmissione dalle generazioni precedenti.

L'esperimento ha esposto alcune femmine di ratto al funghicida vinclozolina che portava come conseguenza effetti gravi sul sistema endocrino (anche all'essere umano).

I ricercatori hanno sottoposto alla terza generazione di ratti test di comportamento e hanno rilevato che i topi erano più ansiosi e predisposti allo stress [99].

Un nuovo studio sui topi ha per la prima volta definito come la dieta influenza il microbioma intestinale e a sua volta la trascrizione dei geni.

Le differenze epigenetiche riguardavano i topi che avevano un microbioma ricco e attivo rispetto a quelli che non lo avevano.

Inoltre, furono messi a confronto topi che seguivano una dieta equilibrata e quelli con dieta squilibrata. I risultati evidenziano come i secondi producevano minor metaboliti.

Un altro studio, dimostra per la prima volta che un disturbo metabolico come il diabete può essere anch'esso trasmesso alla prole per via genetica. L'esperimento sui topi ha dimostrato che gli ovociti e gli spermatozoi trasmettono informazioni genetiche [100].

Dal precedente studio, possiamo dedurre che un fattore importante che potrebbe causare variazioni epigenomiche è la dieta.

La nutrigenomica, è la scienza che studia l'interazione tra dieta, genoma e malattia.

Le differenze individuali nella risposta ai fattori dietetici, in particolare in relazione ai parametri cardiovascolari, sono ben documentate in letteratura.

Lefevre et al., hanno scoperto che una diminuzione del colesterolo lipoproteico a bassa densità in risposta a un intervento dietetico erano inversamente correlate alle concentrazioni di insulina a digiuno pre-trattamento. L'alto consumo di mono- e

disaccaridi, aumenta il rischio di sviluppare una malattia infiammatoria intestinale [101] [102].

I regimi dietetici possono modificare i sintomi della malattia, in parte, attraverso le loro azioni sul microbiota intestinale [103].

Vi sono prove crescenti che le diete caratterizzate dall'alto consumo di acidi grassi omega-6 e omega-3 possono promuovere l'infiammazione.

Esistono infatti, diete antinfiammatorie che sono raccomandate in pazienti obesi o diabetici.

Dang et al. sostiene che ci sia un legame diretto tra malattia parodontale e nutrizione.

Numerosi studi genetici mostrano l'ipotesi che la dieta possa modificare il rischio di malattie croniche tra cui anche la parodontite.

Un elevato apporto calorico, in particolare diete ricche di carboidrati raffinati aumenta i livelli di markers infiammatori e al contrario una dieta equilibrata e povera di carboidrati riduce i marker sistemici di infiammazione e può attenuare gli effetti delle condizioni infiammatorie croniche.

Dowson et al. [104], dimostra l'efficacia terapeutica degli interventi dietetici nel controllo delle condizioni infiammatorie.

Inoltre, anche i farmaci sistemici e dietetici sembrano modulare l'infiammazione [105].

P.3.7 Ruolo dei batteri patogeni parodontali

I principali batteri che si riscontrano nella tasca parodontale sono quelli del gruppo rosso e arancione di Socransky: *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum, Tannarella forsythia, Treponema species, Capnocitytophaga species, Aggregatibacter actinomycetemcomitans.*

La disbiosi batterica orale insieme all'infiammazione cronica altera i meccanismi cellulari e può provocare malattie quali la Parodontite [106].

I batteri patogeni parodontali potrebbero potenzialmente alterare lo stato di metilazione del DNA della cellula ospite. Il microbioma intestinale può provocare modifiche epigenetiche a livello delle cellule epiteliali intestinali così come il microbioma orale può provocarle a livello del cavo orale.

I batteri principalmente coinvolti in queste modifiche sono: *P. Gingivalis, F.Nucleatum e T.denticola.*

Uno studio dimostra che la crescita di cellule epiteliali in presenza di P. Gingivalis induce metilazione del DNA. Il patogeno provocava un'attivazione dei TRL (Toll-like receptor) che inducono acetilazione degli istoni delle cellule epiteliali e attivazione del Fattore nucleare-κb (NFκB) [107].

Nell'uomo esistono undici TRL e sono recettori transmembrana, espressi soprattutto sulla membrana di macrofagi e cellule dendritiche e hanno lo scopo di riconoscere le tipiche strutture di patogeni o microbi e attivare la risposta immunitaria.

Un altro studio, P. gingivalis ha dimostrato ipermetilato TLR2, con conseguente riduzione della difesa innata dell'ospite e aumento della suscettibilità alla malattia (Benakanakere et al. 2015).

Un altro studio supporta l'ipotesi che il contatto a lungo termine delle cellule di fibroblasti parodontali umani (PDL) con P. gingivalis induce ipermetilazione.

La diminuzione dell'espressione dei recettori della superficie cellulare ha influenzato l'adesione delle cellule all'ECM, che ha causato l'inizio di espressione di MMP, fattori

chiave nella degradazione della matrice e nel riassorbimento osseo, nonché nella guarigione delle ferite, proliferazione cellulare, infiammazione e immunità.

Le prove suggeriscono quindi una potenziale associazione tra disbiosi e metilazione dei PRR, i recettori specifici per il riconoscimento di agenti patogeni (Benakanakere et al. 2015).

I batteri, oltre che provocare l'attivazione dei PRR, inducono modificazioni epigenetiche, attivano le vie infiammatorie e aumentano la virulenza.

È stato affermato che Porphyromonas gingivalis e Fusobacterium nucleatum, inducono modifiche epigenetiche quali l'acetilazione degli istoni e la downregolazione del DNA metiltransferasi 1 (DNMT1), in particolare nelle cellule epiteliali. Queste modifiche portano ad una maggiore attivazione dei coattivatori trascrizionali p300 / CBP e ad una maggiore attività di NF-κB (Figura 4) [108].

Inoltre, i PRR, inclusi NOD1 e TLR1 / 2 e TLR4 inducono modifiche all'istone.

Il Lipopolisaccaride LPS, che consente di mantenere una barriera epiteliale contro gli insulti esterni, si pensa possa stimolare la metilazione e l'acetilazione di H3 e H4 nelle cellule B (Larsson et al. 2012), mentre altri hanno osservato che gli inibitori dell'HDAC, che inducono l'acetilazione dell'istone, hanno un effetto protettivo sul riassorbimento osseo indotto da LPS (Cantley et al. 2011).

In conclusione, la malattia parodontale coinvolge molti PRR, tra cui le famiglie NOD1 e TLR e il LPS induce acetilazione degli istoni.

Risultati simili sono stati dimostrati in altri studi successivi (Yin e Chung 2011, de Camargo Pereira et al. 2013).

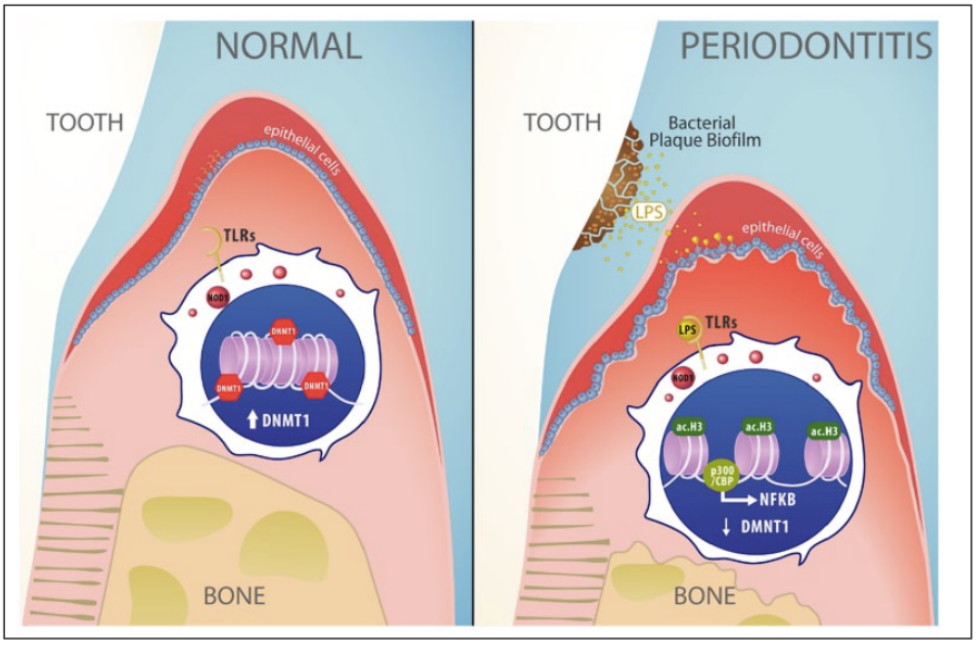


Figura 4. Meccanismo proposto di modulazione epigenetica della malattia parodontale.

Le cellule epiteliali della mucosa orale (blu) presentano DNA metiltransferasi nucleare 1 (DNMT1) e bassi livelli di istone acetilato H3. In caso di disbiosi, i recettori di riconoscimento dei patogeni TLR e NOD1 rilevano concentrazioni aumentate di lipopolisaccaride batterico (LPS) e inducono l'acetilazione della cromatina nelle cellule epiteliali. L'acetilazione dell'istone 3 (ac.H3) porta al rimodellamento della cromatina, a livelli ridotti di DNMT1 e al reclutamento del fattore di co-trascrizione p300 / CBP, con conseguente attivazione del fattore nucleare regolatore della risposta immunitaria (NF) - κ B durante la disbiosi.

In linea con questi risultati, è stato scoperto che Treponema denticola (*T. denticola*), un membro della normale flora microbica del cavo orale, regola cronicamente l'espressione di MMP-2, enzima

MT1-MMP e il gene TIMP-2, con concomitante frammentazione della fibronectina.

Oltre ad essere elevati i livelli e la trascrizione di MMP-2 nella malattia parodontale, sono alti anche l'espressione dei geni che codificano per gli enzimi di modificazione della cromatina.

Questo significa che il patogeno attraverso meccanismi epigenetici svolge un ruolo nell'attivazione e nell'aumento di perdita di tessuto di supporto.

Si può affermare, che i cambiamenti epigenetici cronici nei tessuti parodontali mediati da *T. denticola* o altri batteri, possono contribuire al limitato successo del trattamento, causato da una minor risposta da parte del paziente.

L'esame eseguito su campioni di tessuto umano da siti malati e siti sani ha confermato l'associazione tra *T.denticola* ed elevata espressione di MMP-2 nei tessuti malati.

I tessuti malati hanno mostrato livelli elevati del patogeno insieme a livelli elevati di espressione di mRNA di MMP-2 rispetto ai sani. Nei tessuti sani, i livelli riscontrati erano trascurabili (Figura 5) [109].

Si può dedurre che i livelli elevati di espressione di MMP-2 rispecchiavano lo stato disbiotico, mentre i livelli bassi lo stato di omeostasi fisiologico.

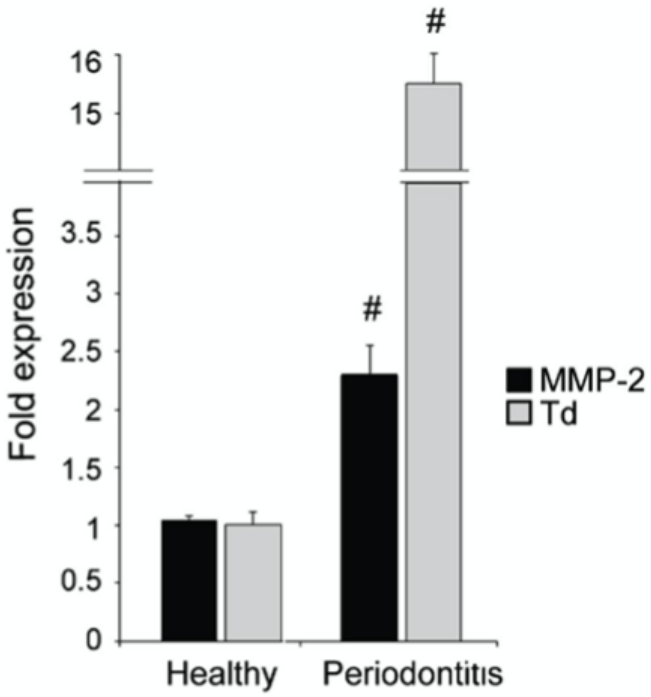


Figura 5. Analizzando I Livelli di *T. denticola* 16S rRNA e MMP-2 mRNA in campioni di tessuto da siti malati o sani mediante qRT-PCR, l'asse X rappresenta i livelli di ciascuno RNA in campioni di pazienti

malati rispetto a campioni sani. L'asse Y rappresenta il file fonte di campioni di tessuto. I dati sono stati analizzati utilizzando il test t di Student. (#) rappresenta $p < 0,001$ rispetto al tessuto sano.

Si può concludere che la disbiosi batterica orale influenza epigeneticamente la segnalazione molecolare della risposta immunitaria, e il modo in cui il microambiente locale attorno alle cellule può svolgere un ruolo nell'attivazione e / o produzione di molecole di segnalazione che influenzano ulteriormente la degradazione dei tessuti e sostengono un'infiammazione cronica [110].

CAPITOLO 4

Applicazione clinica dell'Epigenetica nel campo della Parodontite

P.4.1 Cambiamenti nell'approccio e visione del paziente

Dai nuovi studi emerge sempre di più la possibilità di utilizzare in campo orale il profilo genetico/epigenetico. Grazie alle nuove conoscenze, potremmo essere in grado di elaborare un trattamento personalizzato [111].

I dati forniscono una nuova visione dell'eziologia della parodontite, in particolare riguardo alla risposta dei tessuti alle infezioni, evidenziando che alla base sono presenti i fattori ambientali e genetici che si influenzano a vicenda [112].

Sebbene la perdita ossea sia il risultato comune, il processo biologico probabilmente rappresenta una risposta infiammatoria unica e caratteristica per ogni individuo.

Pertanto, i professionisti devono tenere conto dell'influenza di questi parametri e personalizzare un trattamento di conseguenza [113].

P.4.2 Nuovi possibili metodi di diagnosi e trattamento

Grazie alle nuove conoscenze, si apre un futuro campo di ricerca per individuare in maniera precisa, quali sono i meccanismi epigenetici alla base dello sviluppo e della progressione della Parodontite e quali possono essere i nuovi metodi per individuare i pazienti maggiormente a rischio.

I test genetici e il tampone buccale possono essere nuovi strumenti di diagnosi, mentre i farmaci Epidrugs e i materiali "scaffold" metodi innovativi di trattamento.

Innanzitutto, è necessario precisare che per analizzare i cambiamenti epigenetici bisogna campionare il tessuto bersaglio. Il campionamento di sangue non è indicativo della cavità orale. Pertanto, sono stati presi in considerazione solo i test che analizzano saliva o fluido crevicolare.

P.4.2.1 Test Genetici

Per test genetico, si intende l'analisi di specifici geni, del loro prodotto e della loro funzione, e qualsiasi tipo di indagine del DNA, dell'RNA o dei cromosomi, finalizzati a individuare o escludere mutazioni associate a patologie genetiche [114].

Il test, potrebbe essere aggiunto ai tradizionali strumenti di diagnosi.

È utilizzato per fare prevenzione nei soggetti potenzialmente a rischio o maggiormente predisposti alla malattia e per ottimizzare il piano di trattamento in pazienti con parodontite diagnosticata. Il test può essere consigliato anche ai pazienti sani con storie in famiglia di problematiche parodontali, a soggetti particolarmente fragili (diabetici, pazienti con problemi cardiaci, malattie sistemiche e metaboliche), a soggetti con gravi parodontiti in assenza di grosse quantità di placca e con una buona igiene orale domiciliare. Inoltre, durante la terapia parodontale stessa a pazienti gravi per valutare l'intensità della risposta immunitaria e controllare l'efficacia dell'intervento terapeutico [115].

Il test di suscettibilità genetica per la parodontite grave (Periodontal Susceptibility Test, Interleukin Genetics Inc., Waltham, Mass) è diventato disponibile in commercio dopo le pubblicazioni di uno studio di Kornman et al. [116].

Il test rileva la presenza di una forma specifica di due geni dell'interleuchina:

allele 2 all' IL-1A + 4845 e IL-1B + 3954 loci. I pazienti con entrambi gli alleli sono definiti "Genotipo positivo". La combinazione di questi alleli è responsabile dell'aumentata secrezione di IL-beta che si traduce in una risposta iper-infiammatoria al biofilm, predisponendo così la persona a sviluppare la malattia.

Secondo la revisione di Greenstein et al., la relazione tra i genotipi IL-1 specifici e il livello di IL-1beta non è del tutto chiara, e la capacità del test di prevedere la possibilità che i pazienti sviluppino parodontite cronica è ambigua [117].

Di conseguenza, sono necessarie ulteriori ricerche prima che la valutazione dei polimorfismi disponibili in commercio possa essere integrata nella gestione clinica quotidiana.

Ci sono ad oggi, diversi test genetici in commercio. Di solito, dai test si valutano i polimorfismi VDR, recettore della Vitamina D, che nella variante che aumenta il rischio di parodontite e osteoporosi è (TT), nella variante che non predispone il rischio è (tt) [118].

La variante T esprime un recettore di membrana alterato e ciò causa un legame scorretto con il recettore. Questa variante causa anche maggior predisposizione all'osteoporosi.

Di conseguenza, una conoscenza precoce del problema mediante i test genetici, può mettere nelle condizioni il clinico di poter suggerire o riferire al paziente, che spesso ha osteoporosi già in età giovanile (20-30 anni), di indirizzarsi e rivolgersi già ai centri per la prevenzione del trattamento dell'osteoporosi.

Il test analizza anche molecole della risposta immunitaria come citochine o interleuchine, TNFalfa, e altre.

Le più importanti sono l'IL-1 pro-infiammatoria, e l'IL-10 antinfiammatoria.

Dai risultati spesso si identifica che in pazienti con parodontite aggressiva sono presenti entrambi i polimorfismi, quelli che codificano per un iper-produzione dell'IL-1 o un alterazione nel recettore per l'antagonista per l'IL-1 e pazienti con insufficiente produzione di IL-10, quindi un polimorfismo che codifica un alterata gestione della risposta infiammatoria.

Questi fattori, come abbiamo sottolineato precedentemente, sono in grado di modulare la risposta infiammatoria e immunitaria dell'ospite, rendendolo più o meno predisposto alla malattia.

Inoltre, il test genetico permette di tenere conto delle patologie sistemiche, che sappiamo essere fortemente correlate alla parodontite.

M. Javaid et al., hanno condotto uno studio sul test genetico MyPerioPath (Figura 1) [119].

MyPerioID®

FINAL REPORT

ORALDNA LABS
Innovations in Salivary Diagnostics

Sample, Report

Date Of Birth: 09/20/1980 (36 yrs)
Gender: Female
Patient Id:
Patient Location:

Reason for Testing: Not Provided
Related info: Not Provided
Patient History: Not Provided

Ordering Provider

Ronald McGlennen MD
7400 Flying Cloud Drive
Eden Prairie, MN 55344
855-672-5362

Sample Information

Specimen#: 4385853729
Accession#: 201703-10434
Specimen: Oral Rinse(P)

Collected: 05/10/2017 13:00
Received: 05/11/2017 08:50
Reported: 05/12/2017 09:39

MOLECULAR DETECTION OF IL-6 PERIODONTAL RISK FACTORS

Genotype	Risk
G/G	HIGH

Interpretation:

This individual's interleukin 6 genotype (IL6) is G/G. This MyPerioID result indicates your patient has a high risk for periodontal inflammation due to the genetic variation examined in this test.

Comments:

- Significance: The prevalence of the G/G genotype is reported to be higher in individuals with moderate to severe chronic periodontitis and aggressive periodontitis than in individuals with no periodontal disease. This finding was independent of other risk factors such as age, smoking, ethnic origin. The 'G' allele is associated with overproduction of interleukin-6 (IL-6) cytokine in the presence of pathogenic periodontal bacteria.

- Risk: Individuals carrying an IL6 G allele are associated with increased odds of the concomitant detection of A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis and T. forsynthensis.

- Consider: IL-6 is a potent stimulator of osteoclast differentiation and bone resorption, is an inhibitor of bone formation, and overproduction has been implicated in systemic diseases such as juvenile chronic arthritis, rheumatoid arthritis, osteoporosis, Paget's disease and Sjogren's syndrome. The MyPerioID test assesses one of several risk factors that should be included in an overall evaluation of periodontal disease. Specific bacteria are associated with the initiation of the periodontal disease. Additional risk factors including other genetic markers, smoking, diabetes, and oral hygiene have an amplifying effect on disease progression and duration. The incidence of IL6 genotypes is reported to vary by ethnicity. Additional testing, such as MyPerioPath, may be considered if not already performed.

Methodology: Genomic DNA is extracted and tested for the interleukin 6 genetic variation located at position -174 (rs1800795). This genetic variation is tested by methods of the polymerase chain reaction, endonuclease digestion and resultant restriction fragment detection by automated microcapillary electrophoresis.
Disclaimer: The reported genotypes are a subset of the group of genes that comprise the complete immune system. This genetic analysis may not detect specific immunologic diseases or predict the health and effectiveness of a person's immunity for specific diseases. Such an evaluation may require genetic counseling and testing directed to characterize those genetic conditions. This test was developed and its performance characteristics determined by OralDNA Labs. It has not been cleared or approved by the US Food and Drug Administration.

Ronald McGlennen MD, FCAP, FACMG, ABMG
Medical Director

OralDNA Labs, A Service of Access Genetics, LLC, 7400 Flying Cloud Drive , Eden Prairie, MN 55344 Phone: 855-672-5362; Fax: 952-942-0703 www.oraldna.com
CLIA#: 24D1033809 CAP#: 7190878

PL-000222-D

Web enabled system provided by: access genetics

Figura 1. Referto MyPerioPath

Il DNA del paziente è stato prelevato dalla saliva ed è stato valutato il genotipo dell'interleuchina 6 (IL-6), una citochina coinvolta nella distruzione parodontale.

È stato scoperto che le mutazioni del gene IL-6 predispongono l'insorgenza della parodontite [120].

La scoperta di questi test, consente all'operatore di elaborare un piano terapeutico adatto al paziente in esame e prevenire e trattare precocemente i pazienti cosiddetti "a rischio" con rivalutazioni costanti e richiami di Follow-up più frequenti. Tuttavia, i test sopracitati non valutano le modificazioni epigenetiche.

Esistono anche test genetici effettuati mediante la tecnica bisolfito, che permette di vedere le metilazioni ai promotori dei geni, ma non le modifiche nella forma della cromatina.

Il trattamento deamina le citosine non metilate trasformandole in uracile (che viene successivamente convertito in timina nel DNA), mentre le citosine metilate sono protette da questa conversione [121] [122]. Successivamente, il DNA può essere trattato mediante analisi microarray con sonde, analisi o sequenziamento [123].

La modifica epigenetica può essere identificata allo stesso modo di una modifica della coppia di basi del DNA.

In conclusione, i test genetici valutano la probabilità che il paziente abbia quella problematica ma il limite di questi è la non sito-specificità.

P.4.2.2 Tamponi buccali

L'eventuale utilizzo di tamponi buccali, raschiando la mucosa orale o analizzando la saliva per analisi epigenetiche, potrebbe essere uno strumento diagnostico fattibile.

Fino ad ora, la ricerca sull'uso dei tamponi per l'analisi epigenetica è stata svolta soprattutto in riferimento al cancro orale.

Kusumoto et al., hanno dimostrato che le modificazioni della cromatina e la metilazione del DNA possono essere analizzati con campioni di risciacquo orale di pazienti con carcinoma orale a cellule squamose (OSCC) mediante analisi di immunoprecipitazione della cromatina [124].

Anche da Bocklandt et al., è stato dimostrato che i campioni di saliva possono essere utilizzati per le previsioni dell'età epigenetica [125].

La saliva è quindi un biofluido che fornisce DNA sufficiente per studiare i meccanismi epigenetici [126] [127]. Inoltre, numerosi studi dimostrano che i profili di metilazione del DNA a livello del genoma della saliva sono per più del 90% paragonabili al sangue [128] [129] [130] [131]. Questa contiene molecole rilevanti come microRNA, RNA, markers di infiammazione e anticorpi.

I profili delle citochine salivari sono stati utilizzati con successo come biomarcatori dei disturbi respiratori [132] [133]e il cortisolo è stato studiato dalla saliva per la ricerca che ha esaminato l'impatto dello stress sulla salute e sulle malattie [134].

Inoltre, il DNA salivare è stato utilizzato per identificare geni diversamente metilati in relazione a condizioni sistemiche come il diabete [135].

Eipel et al., hanno dimostrato che il DNA può essere raccolto in modo non invasivo dalle cellule della mucosa orale utilizzando tamponi buccali, ma questi campioni sono costituiti da cellule eterogenee con diversa composizione epigenetica [136].

I dati mostrano che la saliva può essere un utile fonte di DNA per rilevare i segni di metilazione in modo non invasivo e veloce e può essere sito-specifico perché si potrebbe prelevare la saliva nella zona di interesse infiammata.

È ormai certo che l'epigenoma di un tessuto varia non solo cambiando distretto corporeo, ma anche all'interno dello stesso tessuto [137].

Idealmente quindi, le modifiche epigenetiche dovrebbero essere studiate nel tessuto bersaglio.

In conclusione, questa metodica è quella più significativa in campo parodontale, anche se ancora non è utilizzata di frequente.

P.4.2.3 Biopsia

I campionamenti più semplici, essendo veloci e indolori, sarebbero il test genetico o il tampone buccale.

Un'alternativa sarebbe la biopsia di un campione orale come la gengiva, ma questo campionamento sarebbe troppo invasivo per essere applicato quotidianamente nel trattamento clinico. Questo, potrebbe essere analizzato, se il paziente possiede già una biopsia per altre cause.

P.4.2.4 Epidrugs

Uno dei nuovi modelli di trattamento sia nei tumori che nelle malattie infiammatorie sono i farmaci cosiddetti “Epidrug”. Il termine è stato coniato da Ivanov e significa farmaci che inibiscono o attivano le proteine epigenetiche associate alla malattia e che migliorano, curano o prevengono la malattia [138]. Ci sono numerosi studi sull'uso di epidrugs nel campo del cancro, ma al momento mancano ricerche sull’utilizzo di questi in relazione alla salute orale.

Esistono attualmente molecole epigenetiche approvate dalla Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti che vengono studiate nel trattamento del cancro [139], ma stanno emergendo ipotesi sull'uso di epidrugs anche nelle malattie infiammatorie. Gli enzimi dell’istone deacetilasi (HDAC) rimuovono l’acetile dagli istoni, i farmaci inibitori dell’HDAC sono quelli che ne riducono l’azione.

In una recente revisione sull'influenza degli inibitori dell'HDAC (HDACi) sul rimodellamento osseo [140], è stato riportato che influenzano la differenziazione, la maturazione, l'attività degli osteoclasti e che sopprimono la perdita ossea nell'artrite reumatoide (RA) e nella parodontite, di conseguenza possono potenzialmente essere suggeriti come modello di trattamento per queste malattie [141] [142].

Epidrugs è stato suggerito come strumento per migliorare la rigenerazione dei tessuti perché comporta sia la differenziazione delle cellule in cellule osteogeniche che la riduzione dell’infiammazione.

Il trattamento dei fibroblasti del legamento parodontale con HDACi iSodio butirrato ha promosso l'espressione delle proteine correlate agli osteoblasti e ha inibito la produzione di citochine pro-infiammatorie [143].

Nello studio di Cantley ey al., l'uso di HDACi ha dimostrato di sopprimere la perdita ossea alveolare, ma non ha soppresso l'infiammazione gengivale [144].

Al contrario, l'uso dell'inibitore della BET JQ1 inibisce sia la risposta infiammatoria che la perdita ossea alveolare. Le proteine BET sono regolatori epigenetici che interagiscono con gli istoni acetilati e influenzano il meccanismo di trascrizione [145].

In uno studio recente, è stato scoperto che il tessuto parodontale gengivale ha avuto un aumento dell'espressione di mRNA di HDAC1, 5, 8 e 9, e HDAC1 è stato trovato in una quantità significativamente maggiore nel tessuto malato rispetto al tessuto sano [146].

È interessante notare che la proteina HDAC1 è stata trovata nelle cellule infiammatorie indicando un ruolo nella regolazione dell'infiammazione [147].

Il trattamento delle cellule PDL umane con HDACi Trichostatin A (TSA) ha comportato una riduzione dell'HDAC3, un aumento dell'acetilazione dell'istone H3 e l'induzione del differenziamento osteogenico [148].

L'uso dell'inibitore della metilazione del DNA 5-aza-2′-deossicitidina (5-aza) ha aumentato la reattività dei fibroblasti gengivali al TGF-β1, nonché un aumento dei DNMT, suggerendo un nuovo potenziale strumento per migliorare la guarigione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti parodontali [149] [150].

In conclusione, gli Epidrugs sono farmaci promettenti, anche se da provare con certezza è la tossicità e la possibilità di sviluppare resistenza verso questi.

Una caratteristica comune è la mancanza di una capacità intrinseca di riconoscimento della sequenza e la modulazione della loro attività che può teoricamente causare cambiamenti dell'espressione genica dell'intero genoma. Quindi, lo svantaggio generale

degli Epidrug è la loro potenziale mancanza di specificità, che può provocare gravi effetti collaterali [151].

P.4.2.4.1 Ingegneria dei tessuti

La parodontite causa perdita di attacco clinico (CAL) e conseguente perdita di osso radiografico.

L'ingegneria dei tessuti parodontali / medicina rigenerativa si occupa di ripristinare le componenti parodontali, cioè l'osso, il legamento, il cemento e i tessuti molli circostanti [152] [153].

Uno strumento principale utilizzato per la rigenerazione dei tessuti è lo “scaffold”, un materiale nanocomposito polimerico biocompatibile che crea l’ambiente favorevole per le cellule e che induce stimoli adatti alla loro differenziazione.

Sono delle impalcature tridimensionali che sostengono l’architettura cellulare.

La struttura, la topografia e le proprietà dei materiali di un'impalcatura influenzano la differenziazione, la migrazione e l'adesione delle cellule all’impalcatura.

Recentemente, stanno emergendo studi sull'influenza dei materiali e sulla struttura della superficie sui meccanismi epigenetici.

Le cellule cresciute su una superficie rigida hanno una cromatina attiva trascrizionale mentre le cellule cresciute su un materiale morbido hanno una cromatina inattiva trascrizionale [154].

Pertanto, l'epigenetica è stata introdotta come nuova opzione di trattamento nell'ingegneria dei tessuti.

L'idrossiapatite sintetica (Hap) è considerata un potenziale biomateriale adatto per impalcature e rivestimento di impianti. Cellule stromali del midollo osseo e pre-osteoblasti esposti a particelle di Hap nanosized hanno dimostrato di ottenere un pattern di metilazione del DNA alterato.

Impalcature con topografia nanostrutturata sono state suggerite come un potenziale strumento per migliorare l'ingegneria dei tessuti parodontali [155]. Anche se la ricerca su come la topografia superficiale e il materiale influenzano l'epigenoma è agli inizi, le attuali conoscenze indicano un'interessante possibilità di utilizzare materiali e nanotecnologie per promuovere la rigenerazione dei tessuti e le funzioni cellulari attraverso l'epigenetica.

La struttura di un'impalcatura non solo può indurre cambiamenti epigenetici, ma può anche essere utilizzata insieme agli epidrugs.

La silice è un materiale che è stato approvato dalla FDA [156].

Per migliorare l'ingegneria dei tessuti, vengono utilizzate molecole biochimiche per indurre una funzione specifica nelle cellule o per indurre la differenziazione delle cellule verso un tipo di cellula specifica. Combinando le caratteristiche dell'impalcatura con la somministrazione di epidrugs, è possibile migliorare ulteriormente la rigenerazione dei tessuti.

I fibroblasti gengivali umani (HGF) rappresentano una buona fonte cellulare per la rigenerazione dei tessuti parodontali. In un recente studio di Cho e collaboratori [157], gli autori hanno indotto la differenziazione degli HGF in osteoblasti inducendo la demetilazione e l'espressione genica dei fattori osteogenici RUNX2 e ALP. Il trattamento

successivo con BMP2 ha comportato una differenziazione dei fibroblasti in osteoblasti e la formazione ossea.

Inoltre, in un modello di topi in vivo il trapianto di queste cellule insieme al materiale osseo Bio-Oss e al gel di fibrina Tisseel ha comportato un aumento del contenuto minerale osseo e della formazione ossea rispetto ai controlli[158].

Conclusioni

Dagli studi emergono alterazioni delle metilazioni geniche, polimorfismi, citochine, interleuchine, enzimi e proteine in pazienti parodontali rispetto ai sani.

Si è documentato anche che il fumo, il diabete, l'alimentazione e lo stress possono causare modificazioni epigenetiche attraverso la metilazione e l'instaurazione di uno stato di infiammazione cronica. Inoltre, anche i batteri possono causare iper o ipo-metilazione del DNA e acetilazione degli istoni.

Queste differenze, possono verificarsi anche in tessuti diversi all'interno dello stesso individuo e siti diversi dello stesso tessuto.

I dati, permettono di considerare i biomarcatori epigenetici come nuovi possibili agenti diagnostici e la farmaco-epigenetica come potenziale metodo di trattamento [159].

È ormai provato, che i fattori ambientali possono modificare l'epigenoma, e cambiare nel corso del tempo, influendo sulla suscettibilità, progressione e risposta del paziente al trattamento[160]. Questi fattori ambientali riguardano lo stile di vita (stress, alimentazione, igiene orale domiciliare, fumo) che insieme alla predisposizione genetica, patologie acquisite, risposta immunitaria e infiammatoria dell'ospite e presenza di batteri del biofilm possono causare la malattia.

L'obbiettivo che sorge da queste nuove conoscenze, è quello di individuare i pazienti a rischio ed elaborare nuovi metodi di trattamento.

Si può affermare che per capire se un paziente è più predisposto ad ammalarsi si può eseguire il Test genetico che ha valenza generale.

Il metodo di campionamento più semplice e preciso è il tampone buccale, che mostra il profilo epigenetico nel sito infiammato, anche se ancora non è del tutto in uso.

Per il trattamento, le nuove ricerche stanno elaborando farmaci cosiddetti Epidrugs e i materiali "scaffold" che possono aiutare la formazione di osso e diminuire l'infiammazione, anche se gli studi sono ancora agli inizi.

Ad oggi, non c'è uno strumento specifico quotidianamente utilizzato per valutare i cambiamenti epigenetici in siti specifici della gengiva rispetto ad altri, nonostante il tampone buccale potrebbe essere valido.

Lo scopo degli studiosi sarebbe quello di sviluppare strumenti di screening su larga scala e test a basso costo.

Conoscere il profilo epigenetico di un sito della gengiva rispetto ad un altro comporterebbe un cambiamento enorme nella gestione clinica del paziente, perché permetterebbe di individuare non solo i pazienti più a rischio, ma soprattutto quali sono i siti gengivali più coinvolti all'interno dello stesso paziente.

Il risvolto clinico, è il concetto di parodontologia personalizzata, un approccio innovativo che tiene conto delle differenze individuali delle persone. Pertanto, si potrebbero separare i pazienti in diversi gruppi, applicando procedure e consigliando prodotti personalizzati per ognuno [161].

Questi nuovi approcci, potrebbero incorporare programmi per smettere di fumare e ridurre il consumo di alcol, sensibilizzare il paziente su come il trattamento parodontale non chirurgico possa aiutare nella gestione del pre-diabete e del diabete non controllato.

Sarebbe importante anche motivare il paziente a una dieta sana e equilibrata, poiché molti micronutrienti possono influenzare numerose funzioni biologiche, inclusa l'immunità innata e adattiva, nonché la guarigione delle ferite.

Dunque, il compito dell'igienista dentale è proprio quello di fare prevenzione su tutti i livelli e occuparsi non solo della strumentazione parodontale non chirurgica, ma educare il paziente a un corretto stile di vita.

Ciò che cambia è la visione del paziente, concentrandosi sulla valutazione del rischio specifica per ogni individuo aggiungendo anche test genetici o in futuro tamponi buccali, insieme alla consapevolezza dell'operatore di poter aiutare il paziente a prevenire o curare la malattia rendendo anche lui consapevole dell'impatto che le sue abitudini possono avere sul suo epigenoma.

Il presupposto, è che l'individuo deve essere convinto che il problema sia di entità sufficiente per giustificare un'azione. Per questo è importante che il paziente comprenda le motivazioni dei comportamenti che deve adottare per migliorare il suo stato di salute non solo orale, ma generale.

Gli interventi efficaci per il cambiamento dei comportamenti sono:

definizione degli obbiettivi, pianificare il cambiamento di comportamento e autocontrollo. Questo approccio può essere applicato facilmente, consentendo alle persone di riconoscere le problematiche e assumersi la responsabilità per la propria salute [162].

Le informazioni raccolte negli ultimi anni verranno utilizzate in futuro nello sviluppo di nuovi interventi terapeutici, aprendo la strada a trattamenti di medicina personalizzata e regimi di prevenzione [163].

Con il miglioramento delle nuove tecnologie per rilevare le metilazioni del DNA, il costo del sequenziamento dell'intero genoma diminuirà, dando luogo a una nuova ondata dei dati di metilazione del DNA [164].

Bibliografia

[1] https://www.rivistaitalianaigienedentale.it/lapproccio-olistico-al-paziente/

[2] Andrea Di Chiara, il giusto respiro, Capitolo 1: l'Inizio, Pagina 12, Edizione il leone verde, Torino, 2013.

[3]https://www.lescienze.it/news/2017/07/18/news/regolazioni_epigenetiche_ereditarie_topi-3605921/?refresh_ce

[4] https://www.lescienze.it/news/2015/06/03/news/differenze_epigenoma_organi_umani-2633322/

[5] Panos N Papananou, Mariano Sanz, Nurcan Buduneli et al., *Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*, Journal of clinical periodontology, 2018

[6] J. G. Caton, G. Armitage, T. Berglundh, *A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification*, Journal of clinical periodontology 2018.

[7] J. G. Caton, G. Armitage, T. Berglundh, *A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification*, Journal of clinical periodontology 2018.

[8] Gary C. Armitage, Development of a classification system for periodontal diseases and conditions, Annals of periodontology, 1999, 4 (1):1-6.

[9] J. G. Caton, G. Armitage, T. Berglundh, *A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification*, Journal of clinical periodontology 2018.

[10] J. G. Caton, G. Armitage, T. Berglundh, *A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification*, Journal of clinical periodontology 2018.

[11] Panos N Papananou, Mariano Sanz, Nurcan Buduneli et al., *Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*, Journal of clinical periodontology, 2018

[12] J. G. Caton, G. Armitage, T. Berglundh, *A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification*, Journal of clinical periodontology 2018.

[13] Royc. Page, K. Korman, The pathogenesis of human periodontitis:an introduction, Periodontology 2000, 1997. 14:9-11.

[14] R. Darveaun, Netanner & Royc. Page *, The microbial challenge in periodontitis* Periodontology 2000, (Vol. 14, 1997, 12-32).

[15] Consensus Report for Periodontal Diseases: pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol 1996: 1: 92G932.

[16] Tord Berglundh , Nicola U. Zitzmann, Mauro Donati, Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions?16 February 2011,

[17] G.J. Seymour, T. Berglundh, L. Trombelli, Patogenesi della Parodontite, In: Parodontologia clinica e implantologia orale, Journal of clinical periodontology, 6th ed., 188-202, Milano, 2016.

[18] Denis F. Kinane, Philip M. Preshaw and Bruno G. Loos, *Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology* , Journal of periodontology 2011.

[19] Consensus Report for Periodontal Diseases: pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol 1996: 1: 92G932.

[20] R.C. Page, K.S. Konman, The pathogenesis of human periodontitis: an introduction, Periodontology 2000, 1997 (Vol.14).

[21] R.J. Genco, W.S. Borgnakke*, Risk factors for periodontal disease,* Periodontol 2000, 2013.

[22] R.J. Genco, W.S. Borgnakke*, Risk factors for periodontal disease***,** Periodontol 2000, 2013.

[23] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM, Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance, Science, 1993, 259 (5091):87-91.

[24] Shoelson SE, Herrero L, Naaz A., Obesity, infiammation, and insulin resistance, Gastroenterology, 2007, 132 (6):2169-80.

[25] R.J. Genco, W.S. Borgnakke*, Risk factors for periodontal disease,* Periodontol 2000, 2013.

[26] Bosh JA., Engeland CG., Caccioppo JT, Marucha PT., Depressive symptom predict mucosal would healing, Psycosom med 2007:69:597-605.

[27] J. Botelho,V. Machado, P. Mascarenhas, J. Rua, R. Alves, M. Cavacas et al., Stress, salivary cortisol and periodontitis: A systematic review and meta-analysis of observational studies, Archives of oral biology, 2018.

[28] B. Heaton, T. Dietrich, *Causal theory and the etiology of periodontal diseases*, Periodontology 2000, 2012 (Vol.58).

[29] Nanda T., B. Singh, P. Sharma, K. Singh, Cyclosporine A and amlodipine induced gingival overgrowth in kidney transplant recipient: case presentation with literature review, BMJ case reports, 2019, 12(5):e229587.

[30] Irfan A., Basavaraj P., Ashish S., Ritu G., Kuldeep D., Lav Kumar N., Oral Health and Oral Contraceptive - Is it a Shadow behind Broad Day Light? A Systematic Review, Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 2016, 10(11):ZE01-ZE06.

[31] Denis F. Kinane, Philip M. Preshaw and Bruno G. Loos, *Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology* , Journal of periodontology 2011.

[32] B. Heaton, T. Dietrich, *Causal theory and the etiology of periodontal diseases*, Periodontology 2000, 2012 (Vol.58).

[33] Arne Schafer, Ubele Van Der Velden, M. L. Laine, B. G. Loos, Suscettibilità genetica alla malattia parodontale: recenti sviluppi e sfide future, In: Parodontologia clinica e implantologia orale, 6th ed., Milano, 2016.

[34] L'ereditarietà è anche epigenetica, Le scienze 2017 (https://www.lescienze.it/news/2017/07/18/news/regolazioni_epigenetiche_ereditarie_topi-3605921/?refresh_ce).

[35] E.Solomon,C. Martin, D.Martin, L. Berg, Fondamenti di biologia, 7th ed., EdiSES, 2017: 609.

[36] L. Rossi, Epigenetica: parole e fenomeni in cerca di definizione, Zanichelli, 2016 (https://aulascienze.scuola.zanichelli.it/come-te-lo-spiego/2016/11/24/epigenetica-parole-e-fenomeni-in-cerca-di-definizione/).

[37] Che cos'è l'epigenetica, Giuseppe Macino, 2017, istituto di genomica applicata (https://appliedgenomics.org/media/uploads/files/flyer_riassunto_Finale_APR17_uxrjhzG_ki2gUCl.pdf).

[38] nella comparsa dei tumori conta anche l'epigenetica, Agnese Codignola, (https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/ricerca-sul-cancro/tumori-epigenetica).

[39] A.F. Fouad, A.A. Khan, R.M. Silva, Mo.K. Kang, Genetic and Epigenetic characterization of pulpal and periapical infiammation, Frontiers in Physiology 2020.

[40] A ogni organo il suo epigenoma, Le Scienze, 2015 (https://www.lescienze.it/news/2015/06/03/news/differenze_epigenoma_organi_umani-2633322/).

[41] Lena Larsson, Current concepts of epigenetics and its role in periodontitis, Current Oral health reports, 2017.

[42] Lena Larsson, Current concepts of epigenetics and its role in periodontitis, Current Oral health reports, 2017.

[43] G. Ari, S. Cherukuri, A. Namasivaya,Epigenetics and Periodontitis: A Contemporary Review, Journal of clinical and diagnostic research: JCDR,2016, 10(11):ZE07-ZE09.

[44] S. Offenbacher, S. P. Barros, J. D. Beck, Rethinking periodontal infiammation, Journal of periodontology, 2008.

[45] E.Solomon,C. Martin, D.Martin, L. Berg, Fondamenti di biologia, 7th ed., EdiSES, 2017: 609.

[46] Biotecnologie: ricerca e Produzioni Industriali, 2013, p.24, http://www.biotecnologiesicurezza.it/pdf/approfondimento_epigenetica.pdf.

[47] A.M. Lindroth, Y.J. Park, Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis,2013, Journal of periodontal & implant science, 43(3):111-20.

[48] Barski A, Cuddapah S, Cui K, RohTY, Schones DE, Wang Z, et al. Profilatura ad alta risoluzione delle istonemetilazioni nell'umangenoma. Cella 2007; 129: 823-37.

[49] Jones PA. Funzioni della metilazione del DNA: isole, siti di inizio, corpi genici e oltre. Nat Rev Genet 2012; 13: 484-92.

[50] Tan L, Shi YG. Proteine della famiglia Tet e 5-idrossimetilcitosina nello sviluppo e nella malattia. Sviluppo 2012; 139: 1895-902.

[51] Cortessis VK, Thomas DC, Levine AJ, Breton CV, Mack TM, Siegmund KD, et al. Epigenetica ambientale: prospettive di studio della mediazione epigenetica delle relazioni espositive-risposta. HumGenet 2012; 131: 1565-89.

[52] Mendenhall EM, Bernstein BE. Mappe di stato della cromatina: nuove tecnologie, nuove intuizioni. Curr Opin Genet Dev 2008; 18: 109-15.

[53] Cortessis VK, Thomas DC, Levine AJ, Breton CV, Mack TM, Siegmund KD, et al. Epigenetica ambientale: prospettive di studio della mediazione epigenetica delle relazioni espositive-risposta. HumGenet 2012; 131: 1565-89.

[54] SmithZD, MeissnerA. Metilazione del DNA: ruoli nello sviluppo dei mammiferi. Nat RevGenet 2013; 14: 204-20.

[55] S. Phamduong, C. Kim, Presentation of Localized Aggressive Periodontitis in Monozygotic Twins: Case Report., Clinical advances in periodontics, 2019, 9(1):9-14.

[56] Y. Kurushima, P. Tsai, J. Castillo-Fernandez, A. Alves, J. Moustafa, C. Le Roy et al., Epigenetic findings in periodontitis in UK twins: a cross-sectional study, Clinical Epigenetics, 2019, 11(1):277.

[57] Oliveira NF, et al. Stato di metilazione del DNA del promotore del gene IL8 nelle cellule orali di fumatori e non fumatori con parodontite cronica. J Clin Periodontol. 2009; 36 (9): 719 - 25.

[58] Kobayashi T, Ishida K, Yoshie H.Aumentata espressione del trascritto del gene dell'interleuchina-6 (IL-6) in relazione all'ipometilazione del promotore di IL-6 nel tessuto gengivale da pazienti con parodontite cronica. Arch Oral Biol. 2016; 69: 89 - 94.

[59]F. Barazzoni, A. Ghirlanda, Epidemiologia & salute pubblica, Gli studi caso-controllo, 2003,Tribunamedica,p.68,(https://m4.ti.ch/fileadmin/DSS/DSP/UMC/sportello/pubblicazioni/epidem/settembre_2003.pdf)

[60] Neale MC, Cardon L, Organizzazione del Trattato del Nord Atlantico, Divisione Affari scientifici. Metodologia per studi genetici su gemelli e famiglie. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.

[61] Shin SY, et al. Un atlante delle influenze genetiche sui metaboliti del sangue umano. Nat Genet. 2014; 46 (6): 543 - 50.

[62] Reik W, Dean W, Walter J. Riprogrammazione epigenetica nello sviluppo dei mammiferi. Scienza. 2001; 293 (5532): 1089 - 93.

[63] Y. Kurushima, P. Tsai, J. Castillo-Fernandez, A. Alves, J. Moustafa, C. Le Roy et al., Epigenetic findings in periodontitis in UK twins: a cross-sectional study, Clinical Epigenetics, 2019, 11(1):27.

[64] M.Reynolds, Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease, Periodontology 2000, 2014, 64(1):7-19.

[65] A.M. Lindroth, Y.J. Park, Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis,2013, Journal of periodontal & implant science, 43(3):111-20.

[66] L. Larsson, Current Concepts of Epigenetics and Its Role in Periodontitis, Current Oral Health Reports, 2017, 4(4):286-293.

[67] Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. Eur J Med Genet. 2015;58(1):1-10. doi: 10.1016/j.ejmg.2014.10.004 .

[68] Fonseca-Silva T, Oliveira MV, Fraga CA, Farias LC, Gomes EP, Barros LO, et al. DNMT3B (C46359T) polymorphisms and immunoexpression of DNMT3b and DNMT1 proteins in oral lichen planus. Pathobiology. 2012;79(1):18-23. doi: 10.1159/000330171

[69] Oliveira NF, Damm GR, Andia DC, Salmon C, Nociti FH Jr, Line SR, 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. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01446.xx

[70] Larsson L. Current concepts of epigenetics and its role in periodontitis. Curr Oral Health Rep. 2017;4(4):286-93. doi: 10.1007/s40496-017-0156-99.

[71] 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(4):457-66. doi: 10.1038/ng1990.

[72] Irwandi, RA, Vacharaksa A. The role of microRNA in periodontal tissue: a review of the literature. Arch Oral Biol. 2016;72:66-74. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.08.014 .

[73] Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. Front Physiol. 2017;8:910. doi: 10.3389/fphys.2017.009100.

[74] Chibber S, Sangeet A, Ansari SA. Downregulation of catalase by CuO nanoparticles via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. Toxicol Res (Camb). 2017;6(3):305-11. doi: 10.1039/c6tx00416d .

[75] Punj A, Shenoy S, Kumari NS, Pampani P. Estimation of antioxidant levels in saliva and serum of chronic periodontitis patients with and without ischemic heart disease. Int J Dent. 2017;2017:1965697. doi: 10.1155/2017/1965697.

[76] M. C. Coelho, I. Queiroz, J. Filho, S. Aquino, D. Persuhn, N. De Oliveira, miR-9-1 gene methylation and DNMT3B (rs2424913) polymorphism may contribute to periodontitis, Journal of applied oral science, 2020, 28:e20190583.

[77] T. Morelli, C. Agler, K. Divaris, Genomics of periodontal disease and tooth morbidity, Periodontology 2000, 2002, 82(1):143-156.

[78] A.M. Lindroth, Y.J. Park, Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis,2013, Journal of periodontal & implant science.

[79] A.Brodzikowska, R. Gorska, J. Kowalski, Interleukin-1 Genotype in Periodontitis, Archivum immunologiae et therapiae experimentalis, 2019, 67(6):367-373.

[80] WenH, SchallerMA, DouY, HogaboamCM, Kunkel SL. Cellule dendritiche all'interfaccia dell'immunità innata e acquisita: il ruolo dei cambiamenti epigenetici. J Leukoc Biol 2008; 83: 439-46.

[81] A.M. Lindroth, Y.J. Park, Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis,2013, Journal of periodontal & implant science.

[82] Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, et al. (2005) Polimorfismi del gene funzionale nella parodontite aggressiva e cronica. Journal of Dental Research 84: 1149–1153.

[83] Mashhadiabbas F, Neamatzadeh H, Nasiri RF, et al. (2018) Associazione dei polimorfismi del recettore della vitamina D BsmI, TaqI, FokI e ApaI con suscettibilità alla parodontite cronica: una revisione sistematica e una meta-analisi basata su 38 studi caso-controllo,Journal of Dental Research (Isfahan) 15: 155–65.

[84] Scapoli L., Carinci F., Muchhi D., Nota A., Caruso S., Rossi D., et al., Evaluation of IL6, IL10 and VDR alleles distribution in an Italian large sample of subjects affected by chronic periodontal disease, International Journal of immunopathology and pharmacology, 2019.

[85] A.Brodzikowska, R. Gorska, J. Kowalski, Interleukin-1 Genotype in Periodontitis, Archivum immunologiae et therapiae experimentalis, 2019, 67(6):367-373.

[86] A.M. Lindroth, Y.J. Park, Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis,2013, Journal of periodontal & implant science, 43(3):111-20.

[87] E. Solomon, C. Martin, D.Martin, L. Berg, Fondamenti di biologia, 16.1 Lo studio della genetica umana, ed. EdiSES, 2017: 609.

[88] A.M. Lindroth, Y.J. Park, Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis,2013, Journal of periodontal & implant science, 43(3):111-20.

[89] Fitzpatrick DR, Wilson CB. Metilazione e demetilazione nella regolazione di geni, cellule e risposte nel sistema immunitario. Clin Immunol 2003; 109: 37-45.
Zhang S, Barros SP, Moretti AJ, Yu N, Zhou J, Preisser JS, et al. Regolazione epigenetica dell'espressione di TNFA nella malattia parodontale. J Periodontol 2013 Jan 31 [Epub]. http: // dx.doi.org/10.1902/jop.2013.120294.

[90] Fitzpatrick DR, Wilson CB. Metilazione e demetilazione nella regolazione di geni, cellule e risposte nel sistema immunitario. Clin Immunol 2003; 109: 37-45.
Zhang S, Barros SP, Moretti AJ, Yu N, Zhou J, Preisser JS, et al. Regolazione epigenetica dell'espressione di TNFA nella malattia parodontale. J Periodontol 2013 Jan 31 [Epub]. http: // dx.doi.org/10.1902/jop.2013.120294.

[91] H. Toker, E. Gorgun, E. Korkman, Analysis of IL-6, IL-10 and NF-kB gene polymorphisms in Agressive and Chronic Periodontitis, Central European journal of public health, 2017, 25(2):157-162.

[92] L. Larsson, Current Concepts of Epigenetics and Its Role in Periodontitis, Current Oral Health Reports, 2017, 4(4):286-293.

[93] Qiao Shi, Qingxian Luan, Xiaoxuan Wang, Yu Cai, Correlation study on mtDNA polymorphisms as potential risk factors in aggressive periodontitis by NGS, Oral diseases, 2020, 26(2): 401-408.

[94] PinhoMde N, Pereira LB, de Souza SL, Palioto DB, Grisi MF, Novaes AB Jr, et al. Effetto a breve termine dell'inibitore selettivo della COX-2 come coadiuvante per il trattamento della malattia parodontale: uno studio clinico in doppio cieco sugli esseri umani. BrazDent J 2008; 19: 323-8.

[95] Zhang S, Barros SP, Niculescu MD, Moretti AJ, Preisser JS, Offenbacher S. Alterazione della metilazione del promotore PTGS2 parodontite cronica. JDent Res 2010; 89: 133-7.

[96] T. Morelli, C.S. Agler, K.Divaris, Genomics of periodontal disease and tooth morbidity, Periodontology 2000, 2020, 82(1):143-156.

[97] R. Emfietzoglou, E. Pachymanolis, C. Piperi, Impact of Epigenetic alterations in the development of oral diseases, current medicinal chemistry, 2020.

[98] M. A. Reynolds, Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease, Periodontology 2000,2013, Vol.64 (1):7-19.

[99] Paul Sutherland National Geographic, Gli effetti dei pesticidi colpiscono fino alla terza generazione, 2012.

[100] Eric Erbe, Dalla dieta all'epigenetica, passando per il microbioma, le scienze 2016. Cortesia Min Liu, La trasmissione epigenetica di obesità e diabete, Le scienze 2016.

[101] Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, Folkerts G, Friedmann PS, Frost GS, Guarner 156. F, Løvik M, Macfarlane S, Meyer PD, M'Rabet L, Serafini M, van Eden W, van Loo J, Vas Dias W, Vidry S, Winklho- fer-Roob BM, Zhao J. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. Br J Nutr 2009: 101 (Suppl. 1): S1–S45.

[102] Gentschew L, Ferguson LR. Role of nutrition and microbi- ota in susceptibility to inflammatory bowel diseases. Mol Nutr Food Res 2012: 56: 524–535.

[103] Gentschew L, Ferguson LR. Role of nutrition and microbi- ota in susceptibility to inflammatory bowel diseases. Mol Nutr Food Res 2012: 56: 524–535.

[104] Dawson D, Branch-Mays G, Gonzalez OA, Ebersole JL. Die- tary modulation of the inflammatory cascade. Periodontol 2000 2014: 64: 161–197.

[105] M. A. Reynolds, Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease, Periodontology 2000, 2013, Vol.64(1):7-19.

[106] Baumgart e Carding 2007; Kornman 2008; De Palma et al.2010; Jiao et al.2014.

[107] L. Larsson, Current Concepts of Epigenetics and Its Role in Periodontitis, Current Oral Health Reports, 2017, 4(4):286-293.

[108] M. Martins, Y. Jiao, L. Larsson, L. Almeida, C. Garaicoa-Pazmino, J.M., et al., Le, Epigenetic Modifications of Histones in Periodontal Disease, Journal of dental research, 2015, 95(2):215-22.

[109] I.Ateia, P. Sutthiboonyapan, P. Kamarajan, T. Jin, V. Godovikova, Y. Kapila, et al, Treponema denticola increases MMP-2 expression and activation in the periodontium via reversible DNA and histone modifications, Cellular microbiology, 2018, 20(4):10.

[110] L. Larsson, Current Concepts of Epigenetics and Its Role in Periodontitis, Current Oral Health Reports, 2017, 4(4):286-293.

[111] S. Barros, F. Fahimipour, R. Tarran, S. Kim, R. Mantuanel, S. Caminaga et al., Epigenetic reprogramming in periodontal disease: Dynamic crosstalk with potential impact in oncogenesis, Periodontology 2000, 2020, 82(1):157-172.

[112] A.M. Lindroth, Y.J. Park, Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis,2013, Journal of periodontal & implant science, 43(3):111-20.

[113] S. Razzouk, O. Termechi, Host genome, epigenome, and oral microbiome interactions: toward personalized periodontal therapy, Journal of periodontology, 2013, 84(9):1266-71.

[114] G. Novelli, Enciclopedia della Scienza e della Tecnica , 2008, https://www.treccani.it/enciclopedia/test-genetico_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/.

[115] Dentalbios,https://dentalbios.it/test-del-dna/;
AAP – American Academy of Periodontology, https://www.perio.org/?q=faq-page#n258,https://www.perio.org/consumer/other-diseases;
SFPIO – Société Française de Parodontologie et d'Implantologie Orale, http://www.sfparo.org/espace-grand-public/informations-patients/55-parodontite.html ;

[116] Kornman KS, Crane A, Wang HY, et al. The interleukin-1 geno- type as a severity factor in adult periodontal disease. J Clin Periodontol 1997;24(1):72-7.

[117] Greenstein G., Hart T., Clinical utility of a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis, Journal of the American dental association,2002, Vol.13, 133 (4):492-3.

[118] Medicina e informazione, Decalogo per la salute della bocca, dei denti e delle gengive, www.medicinaeinformazione.com, https://www.parodontite.it/test-genetici-rischio-parodontite/.

[119] M. Javaid, A. Ahmed, R. Durant, S. Tran, Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases, Journal of oral biology and craniofacial research, 2016, 6(1):66-75.

[120] Canzone GG, Choi SJ, Ji JD, Lee YH. Associazione tra tumore Fattore di necrosi-promotore alfa -308A / G, -238 A / G, interleuchina6 -174 G / C e -572 G / C polimorfismi e malattia parodontale: una meta-analisi. Mol Biol Rep. 2013; 40 (8): 5191 - 5203.

[121] Wang RY, Gehrke CW, Ehrlich M. Confronto della modifica del bisolfito dei residui di 5-metildeossicitidina e deossicitidina. Ris. Acidi nucleici 1980; 8: 4777–90.
Hayatsu H. Scoperta della conversione della citosina mediata dal bisolfito in uracile, la reazione chiave per l'analisi della metilazione del DNA - un resoconto personale. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2008; 84: 321-30.

[122] Swarnaseetha Adusumalli, Mohd Feroz Mohd Omar, Richie Soong and Touati Benoukraf, Methodological aspects of whole-genome bisulfite sequencing analysis, Briefings in Bioinformatics, 2015, 16(3):369-79.

[123] Harrison A, Parle-McDermott A. Metilazione del DNA: una sequenza temporale 34. di metodi e applicazioni. Genet anteriore 2011; 2: 74.

[124] Kusumoto T, Hamada T, Yamada N, Nagata S, Kanmura Y, HoujouIo, et al. Analisi epigenetica completa utilizzando campioni di risciacquo orale: uno studio pilota. J Oral Maxillofac Surg. 2012; 70: 1486 - 94. doi: 10.1016/j.joms.2011.04.021.

[125] Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sanchez FS, Sinsheimer JS, Horvat S and Vilain E, Epigenetic predictor of age, PLos One,2011;6:e148211.

[126] Goode MR, Cheong SY, Li N, Ray WC, Bartlett CW. Raccolta ed estrazione del DNA della saliva per il sequenziamento di nuova generazione. J Vis Exp 2014, (90):51697.

[127] Wu HC, Wang Q, Chung WK, Andrulis IL, Daly MB, John EM, et al. Correlazione dei livelli di metilazione del DNA nel sangue e nel DNA della saliva nelle ragazze giovani dello studio LEGACY Girls. Epigenetica 2014; 9: 929-33.

[128] Smith AK, Kilaru V, Klengel T, Mercer KB, Bradley B, Conneely KN, et al. DNA estratto dalla saliva per studi di metilazione dei tratti psichiatrici: evidenza della specificità dei tessuti e della correlazione con il cervello. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2015; 168B: 36-44

[129] Thompson TM, Sharfi D, Lee M, Yrigollen CM, Naumova OY, Grigorenko EL. Confronto di modelli di metilazione del DNA intero in linee cellulari di sangue intero, saliva e linfoblastoidi. Behav Genet 2013; 43: 168-76.

[130] Langie SA, Szarc Vel Szic K, Declerck K, Traen S, Koppen G, Van Camp G, et al. Profilazione della metilazione dell'intero genoma della saliva e del DNA del sangue in soggetti con allergia respiratoria. PloS one 2016; 11: e0151109 .

[131] Langie S, Szic KSV, Van der Plas E, Declerck K, Moisse M, Koppen G, et al. Programmazione ambientale dell'allergia respiratoria nell'infanzia: l'applicabilità della saliva. Allergy 2015; 70: 236

[132] Wren ME, Shirtcliff EA, Drury SS. Non tutti i biofluidi sono uguali: masticando la diagnostica salivare e l'epigenoma. Clin Ther 2015; 37: 529-39 .

[133] Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C.Potenziale diagnostico della saliva: stato attuale e applicazioni future. Chimica clinica 2011; 57: 675-87.

[134] Kirschbaum C, Dirk H Hellhammer. Cortisolo salivare. In: Fink G, editore. Enciclopedia dello stress. Academic Press CA 2000; 379-83 .

[135] Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C.Potenziale diagnostico della saliva: stato attuale e applicazioni future. Chimica clinica 2011; 57: 675-87.

[136] Eipel M, Mayer F, Arent T, Ferreira MRP, Birkhofer C, Gerstenmaier U, et al. Le previsioni dell'età epigenetica basate sui tamponi buccali sono più precise in combinazione con le firme di metilazione del DNA specifiche del tipo di cellula. Invecchiamento. 2016; 8: 1034 – 44.

[137] Lena Larsson, Current concepts of epigenetics and its role in periodontitis, Current Oral health reports, 2017, 4(4):286-293.

[138] Ivanov M, Barragan I, Ingelman-Sundberg M. Epigenetic mecha- nisms of importance for drug treatment. Trends Pharmacol Sci. 2014;35:384–96 .

[139] Martins MD, Castilho RM. Istoni: controllo della circolazione di segnalazione del tumore. J cancerog mutageno. 2013; 29 (suppl.5): 1 - 12.

[140] Cantley MD, Zannettino ACW, Bartold PM, Fairlie DP, Haynes DR. Istone deacetilasi (HDAC) nel rimodellamento osseo fisiologico e patologico. Bone. 2017; 95: 162 - 74.

[141] Cantley MD, Fairlie DP, Bartold PM, Rainsford KD, Le GT, Lucke AJ, et al. Inibitori delle istone deacetilasi di classe I e II sopprimere gli osteoclasti umani in vitro. J Cell Physiol. 2011; 226: 3233 - 41.

[142] Cantley MD, Bartold PM, Marino V, Fairlie LGT, Lucke AJ, et al. Inibitori dell'istone deacetilasi e perdita ossea parodontale. Ris. Parodontale J 2011; 46: 697 - 703 .

[143] Kim TI, Han JE, Jung HM, Oh JW, Woo KM.. Analysis of histone deacetylase inhibitor-induced responses in human periodontal ligament fibroblasts, Biotechnology letters, 2013, 35(1):129-33.

[144] Cantley MD, Bartold PM, Marino V, Fairlie LGT, Lucke AJ, et al. Inibitori dell'istone deacetilasi e perdita ossea parodontale. Ris. Parodontale J 2011; 46: 697 – 703.

[145] Meng S, Zhang L, Tang Y, Tu Q, Zhen L, Yu D, et al. L'inibitore BET JQ1 blocca l'infiammazione e la distruzione ossea. J Dent Res. 2014; 93: 657 - 62.

[146] Cantley MD, Dharmapatni AA, Algate K, Crotti TN, Bartold PM, Haynes DR. Espressione dell'istone deacetilasi di classe I e II nel tessuto gengivale della parodontite cronica umana. J periodont Res. 2016; 51: 143 – 51.

[147] Cantley MD, Dharmapatni AA, Algate K, Crotti TN, Bartold PM, Haynes DR. Espressione dell'istone deacetilasi di classe I e II nel tessuto gengivale della parodontite cronica umana. J periodont Res. 2016; 51: 143 - 51.

[148] Huynh NC-N, Everts V, Pavasant P, Ampornaramveth RS. L'inibizione delle istone deacetilasi migliora la differenziazione osteogenica delle cellule del legamento parodontale umano. J Cell Biochem. 2016; 117: 1384 - 95 .

[149] Sufarn IG, Beikircher G, Weinhausel A, Gruber R. Gli inibitori della metilazione del DNA supportano l'espressione di IL11 indotta da TGF-b1 nei fibroblasti gengivali. J Periodontal Implant Sci. 2017; 47: 66 - 76.

[150] L. Larsson, Current Concepts of Epigenetics and Its Role in Periodontitis, Current Oral Health Reports, 2017, 4(4):286-293.

[151] Shin D.G., Bayarsaihan D., A novel Epi-Drug Therapy based on the suppression of BET family epigenetic readers, The yale journal of biology and medicine, 2017, 90(1):63-71.

[152] Larsson L, Decker AM, Nibali L, Pilipchuk SP, Berglundh T, Giannobile WV. Medicina rigenerativa per malattie parodontali e periimplantari. J Dent Res. 2016; 95: 255 – 66.

[153] L. Larsson, Current Concepts of Epigenetics and Its Role in Periodontitis, Current Oral Health Reports, 2017, 4(4):286-293.

[154] Rabineau M, Flick F, Mathieu E, Tu A, Senger B, Voegel JC, et al. Guida cellulare in stato di quiescenza attraverso il rimodellamento della cromatina indotto dal modulo elastico del substrato. Biomateriali. 2015; 37: 144 - 55.

[155] Du M, Duan X, Yang P. Cellule staminali pluripotenti indotte e rigenerazione parodontale. Curr Oral Health Rep.2015; 2: 257 - 65.

[156] Lorden ER, Levinson HM, Leong KW. Integrazione di sistemi di rilascio di farmaci, proteine e geni con la medicina rigenerativa. Drug Deliv Transl Res. 2001; 5: 168 - 86.

[157] Cho Y, KimB, Bae H, KimW, Baek J, WooK, et al. Transdifferenziazione diretta di fibroblasti / osteoblasti gengivali tramite epigenetica. J Dent Res. 2017; https://doi.org/10.1177/00220 .

[158] Cho Y, KimB, Bae H, KimW, Baek J, WooK, et al. Transdifferenziazione diretta di fibroblasti / osteoblasti gengivali tramite epigenetica. J Dent Res. 2017; https://doi.org/10.1177/00220 .

[159] P.M. Bartold, Lifestyle and periodontitis: The emergence of personalized periodontics, Periodontology 2000, 2018, 78 (1):7-11.

[160] Chapple IL, Bouchard P, Cagetti MG, et al. Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA work- shop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2017;44(Suppl 18):S39-S51.

[161] P.M. Bartold, Lifestyle and periodontitis: The emergence of personalized periodontics, Periodontology 2000, 2018, 78 (1):7-11.

[162] P.M. Bartold, Lifestyle and periodontitis: The emergence of personalized periodontics, Periodontology 2000, 2018, 78 (1):7-11.

[163] A.M. Lindroth, Y.J. Park, Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis, 2013, Journal of periodontal & implant science, 43(3):111-20.

[164] Harrison A., Parle-McDermont A., DNA methylation: a timeline of methods and applications, Frontiers in genetics, 2011, 2:74.

Ringraziamenti

In primo luogo, vorrei ringraziare il mio relatore, il Prof. Piva Francesco, che mi ha guidata fin dall'inizio grazie alla sua enorme conoscenza della materia. Mi ha accompagnato passo a passo in questo percorso, chiarendo ogni mio dubbio o incertezza ogni qualvolta ne avessi bisogno. Grazie a lui, sono riuscita ad acquisire un bagaglio di conoscenze preziose.

Vorrei ringraziare la Prof.ssa Scilla Sparabombe, mia correlatrice e direttrice ADP cdL in igiene dentale, che nel corso di questi tre anni mi ha trasmesso la passione e la dedizione per la professione e mi ha guidata nel completamento nonché fine ultimo della tesi.

Un ringraziamento speciale alla mia famiglia, che mi ha sostenuta e permesso di percorrere e concludere questo cammino. Grazie per la pazienza che avete avuto nel gestire i miei momenti di sconforto.

Grazie alle mie più care amiche, che mi hanno sempre ascoltato e supportato in ogni momento.

Un pensiero particolare va alle mie compagne di corso Roksolana e Alessia, con cui ho condiviso momenti di rabbia e di gioia. Senza il nostro legame, non avrei svolto questo percorso in questo modo.

Un enorme grazie va ad Alessandro, mio compagno di vita e mio migliore amico. Grazie per essermi sempre stato vicino, per avermi incoraggiato, consolato, rimproverato e gioito con me quando ne avevo più bisogno. Sei la persona che più di tutti devo ringraziare, perché senza di te non sarei quella che sono ora.