



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

**AVALIAÇÃO DOS MICRORNAS 29B E 142 E SUAS RELAÇÕES COM AS
DNAMETILTRANSFERASES E AS METALOPROTEINASES NA PERIODONTITE**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Dezembro/2018

NAYÁGARA MOREIRA DIAS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS MICRORNAS 29B E 142 E SUAS RELAÇÕES COM AS
DNAMETILTRANSFERASES E AS METALOPROTEINASES NA PERIODONTITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra

Co- Orientadora: Profa. Dra. Paula Rocha Moreira

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Dezembro/2018

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar, e nunca me abandonar.

Aos meus pais e meu noivo Mattheus Mercury por me apoiarem e estarem presente em todas as minhas decisões.

A minha orientadora professora Walderez Ornelas Dutra por todo apoio, confiança e infraestrutura disponibilizada nos Laboratórios de Biologia das Interações Celulares e Biologia Molecular da UFMG

Minha querida co-orientadora professora Paula Rocha pela oportunidade de aprender, carinho e confiança.

Ao Luiz Paulo Carvalho, Simone Amormino, Telma Arão, Rafael Lima pelas valiosas contribuições na execução desse trabalho.

A todos os amigos e professores do laboratório de Biologia das Interações Celulares/UFMG, pela disponibilidade em ajudar sempre, especialmente professora Juliana Assis; professora Micena Miranda; Tereza Cal, Bruna Fernandes, Marina Luiza Rodriguês, Otoni Alves.

A professora Érika Jorge do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento (ICB-UFMG), pelo carinho e atenção, sempre disposta em solucionar minhas dúvidas.

Ao Instituto de Ciências Biológicas e à Faculdade de Odontologia da UFMG, aos pacientes e todos aqueles que participaram de forma direta e indiretamente, e permitiram que esse trabalho fosse realizado.

Novamente, muito obrigada por tudo, vocês foram fundamentais para eu chegar até aqui.

**“Agora este não é o fim. Não é nem o começo do fim. Mas é, talvez, o fim
do começo.”**

Winston Churchill

RESUMO

A periodontite crônica (PC) é uma doença bucal multifatorial, polimicrobiana caracterizada pela inflamação dos tecidos de suporte e inserção dos dentes, levando a destruição do tecido periodontal. A patogênese da PC compreende complexas interações entre os patógenos periodontais e a resposta imune do hospedeiro. Fatores envolvidos com a regulação gênica podem interferir na predisposição ao aparecimento dos sinais e sintomas da doença. Neste aspecto, incluem-se os mecanismos epigenéticos nos quais destacam-se a metilação do DNA e o MicroRNA. O objetivo deste trabalho foi avaliar a transcrição dos microRNAs 142 e 29-b, e suas relações com as DNAmetiltransferases (DNMT) e as metaloproteinases (MMP)-2 e 9 na PC. Foram coletadas biópsias de tecidos gengivais de pacientes saudáveis, como grupo controle, e com PC, sendo no total 17 pacientes para cada grupo. As amostras foram submetidas à avaliação histológica para caracterização amostral, à extração do RNA Total e à conversão em cDNA e qPCR. Observou-se que a quantificação dos miRNAs 29b e 142-3p estava maior na PC comparada grupo controle. Maiores níveis de MMP-2 e menores níveis de DNMT1 foram verificadas no grupo PC. Análises de correlação no grupo PC entre os miRNAs avaliados e seus possíveis alvos mostraram correlação negativa tanto do miRNA142-3p quanto do miRNA 29b com MMP2; assim como correlação positiva do miRNA 142-3p com a DNMT1. Estudos adicionais são necessários para avaliar a relevância funcional desses achados.

Palavras-chave: Periodontite crônica, miRNA, DNMT, MMP

ABSTRACT

The pathogenesis of CP comprises complex interactions between periodontal pathogens and the immune response of the host. Factors involved in gene regulation may interfere with the predisposition of the beginning of disease signs and symptoms. In this aspect, are included the epigenetic mechanisms, which the DNA methylation and microRNA stand out. The objective of this work was to evaluate the transcription of microRNAs 142 and 29-b, and their relationships with DNA methyltransferases (DNMT) and metalloproteinases (MMP) -2 and 9 in CP. Gingival tissue biopsies were collected from healthy patients, as a control group, and with CP, with a total of 17 patients for each group. The samples were submitted to histological evaluation for sample characterization, extraction of Total RNA and conversion to cDNA and qPCR. We observed that the quantification of miRNAs 29b and 142-3p was higher in the CP compared to the control group. Higher levels of MMP-2 and lower levels of DNMT1 were observed in the CP group. Correlation analyzes in the CP group between the miRNAs evaluated and their possible targets showed a negative correlation between both miRNA142-3p and miRNA 29b with MMP2; as well as a positive correlation of 142-3p miRNA with DNMT1. Further studies are needed to evaluate the functional relevance of these findings.

Key words: Chronic periodontitis, miRNA, DNMT, MMP

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 Esquema do processo de formação da 5-Metilcitosina (5-MeC) pela DNA metiltransferase (SULEWSKA, 2007).

Figura 2 – Biogênese do microRNA (LIN & GREGORY, 2015).

Figura 3 – Stem-loop RT-PCR miRNA assays. (VARKONYI, 2007).

Figura 4- Características dos grupos de estudo. * $p < 0,05$

Figura 5 - Correlações estatisticamente relevantes.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Quantificação relativa média do miR142-3p (A) e miRNA 29b (B) nos grupos PC (n=17) e C (n=17) ($p < 0.05$ Teste Mann-Whitney).

Gráfico 2 - Quantificação relativa média (RQ) do DNMT1 nos grupos PC (n=17) e C (n=17) por ($p < 0.05$ Teste Mann-Whitney).

Gráfico 3 - Quantificação relativa média (RQ) do DNMT3a e DNMT3b nos grupos PC (n=17) e C (n=17) ($p < 0.05$ Teste Mann-Whitney).

Gráfico 4 - Quantificação relativa média das MMP-2 (A) e MMP-9 (B) nos grupos PC (n=17) e C (n=17) ($p < 0.05$ Teste Mann-Whitney).

Gráfico 5 - Correlação entre miRNA 29b e DNMT nos grupos PC (n=17) e C (n=17). (Spearman).

Gráfico 6 - Correlação entre miRNA 142-3p e DNMT nos grupos PC (n=17) e C (n=17) (Spearman).

Gráfico 7 - Correlação entre miRNA 29b e MMPs nos grupos PC (n=17) e C (n=17) (Spearman).

Gráfico 8 - Correlação entre miRNA 142-3p e MMPs nos grupos PC (n=17) e C (n=17) (Spearman).

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1- Características dos grupos de estudo

LISTA DE ABREVIATURAS

C: grupo controle

cDNA: DNA complementar

COEP: Comitê de Ética em Pesquisa

Ct: limiar de detecção a cada ciclo de amplificação

DNMT: DNA metiltransferase

FO-UFMG: Faculdade de Odontologia UFMG

HDAC: deacetilases de histonas

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IPSEMG: Instituto de Previdência dos Servidores de Minas Gerais

MEC: Matrix Extracelular

miRNA: microRNA

MMP: Metaloproteinase

mRNA: RNA mensageiro

PC: periodontite crônica

qRT-PCR: PCR em Tempo Real quantitativo

RNA: ácido ribonucleico

RQ: quantificação relativa

RT-PCR: reação de transcrição reversa

TCLR: termo de consentimento livre e esclarecido

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

μL: microlitros

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 3 OBJETIVOS | 23 |
| 3.1 Objetivos Gerais | 23 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 23 |
| 4 METODOLOGIA | 24 |
| 4.1 Considerações Éticas | 24 |
| 4.2 Seleção Clínica das Amostras | 24 |
| 4.3 Avaliação da seleção Histológica | 25 |
| 4.4 Avaliação do miRNA-29b e do miRNA 142-3p | 26 |
| 4.4.1 Extração do RNA Total e conversão em cDNA..... | 26 |
| 4.5 Avaliação das DNMT 1, DNMT 3a, DNMT3b e MMP-2, MMP9 | 28 |
| 4.5.1 Extração do RNA Total e conversão em cDNA | 28 |
| 4.6 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) | 29 |
| 4.7 Análise estatística | 29 |
| 5 RESULTADOS | 30 |
| 5.1 Dados clínicos, demográficos e histológico | 30 |
| 5.2 miRNA 29b e miRNA 142-3p | 31 |
| 5.3 DNMTs | 32 |
| 5.3.1 DNMT 1 | 32 |
| 5.3.2 DNMT 3A e DNMT 3B | 32 |
| 5.4 MMP-2 e MMP-9 | 33 |
| 5.5 Correlações entre os miRNAs e as DNMTs | 33 |
| 5.5.1 miRNA 29b versus DNMTs..... | 34 |
| 5.5.2 miRNA 142-3p versus DNMTs | 36 |
| 5.6 Correlações entre os miRNAs e as MMPs | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 5.6.1 miRNA 29b versus MMPs..... | 37 |
| 5.6.2 miRNA 142-30 versus MMPs | 38 |
| 5.7 Correlações com dados clínicos..... | 35 |
| 5.8 Resumos dos resultados | 39 |
| 6 DISCUSSÃO | 40 |
| 7 CONCLUSÃO | 45 |
| REFERÊNCIAS..... | 46 |
| APÊNDICES..... | 57 |
| Apêndice A | 57 |
| Apêndice B | 58 |
| ANEXOS | 59 |
| Anexo A | 59 |
| Anexo B | 60 |

1) INTRODUÇÃO

A doença periodontal é considerada uma doença multifatorial e sua etiologia consiste da interação de uma microbiota específica com o sistema imune do hospedeiro (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994). Periodontopatógenos e os seus fatores de virulência ativam a resposta imuno-inflamatória promovendo a liberação de mediadores inflamatórios que participam da destruição óssea e do ligamento periodontal (ISHIKAWA, 2007). Dentre as formas clínicas principais da doença periodontal, destaca-se a periodontite crônica (PC). A PC é uma doença bucal infecciosa caracterizada por uma reação inflamatória destrutiva que pode gerar a perda de tecido de suporte dentário (MOORE & MOORE, 1994). A presença de fatores locais é compatível com a gravidade da doença e a sua taxa de progressão não é linear, apresentando períodos de atividade e de quiescência (LINDHE *et al.* 1989; ARMITAGE, 1999). Sua prevalência é maior em adultos, mas pode ocorrer em indivíduos jovens (PAGE & SCHROEDER, 1997).

O cenário atual para o entendimento da patogenia das periodontites implica em considerá-las infecções com uma microflora altamente virulenta e/ou um hospedeiro altamente susceptível. Esta susceptibilidade pode ser referente aos fatores envolvidos com a regulação gênica, interferindo na predisposição ao aparecimento dos sinais e sintomas da doença. Dentro da regulação gênica, evidenciam-se os mecanismos epigenéticos envolvendo modificadores no DNA (GOPISETT *et al.*, 2006). As primeiras evidências que relacionam as alterações epigenéticas com a PC são baseadas na análise do perfil de metilação em genes relacionados à resposta imune (AMORMINO *et al.* 2013; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético caracterizado pela adição de um grupo metil no carbono 5` do anel de citosina, inibindo efetivamente a transcrição gênica (RICHARDSON, 2003; BAYLIN, 2005). A adição do grupo metil em citosinas presentes em regiões ricas em citosina e guanina (ilhas CpG) é feita por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMT-1, DNMT-2, DNMT-3A e DNMT-3B) (BAYLIN, 2005; ADCOCK *et al.*, 2007; JOHNSON & BELSHAW, 2008). A DNMT-1 é responsável por manter a metilação do DNA durante a sua replicação. A DNMT-2 participa no reconhecimento do dano, reparo de mutação e recombinação do DNA. As DNMT-3A e B são mediadoras do estabelecimento de um novo padrão de metilação (FITZPATRICK & WILSON, 2003; BAYLIN, 2005; GOPISETTY *et al.*, 2006).

A indução da metilação por DNMTs pode ser influenciada por alguns fatores, como inflamação crônica, agentes infecciosos e hábitos, como o tabagismo (BAYLIN, 2005). As presenças constantes de inflamação e de bactérias na periodontite suportam a hipótese de alteração do epigenoma na periodontite (ADCOCK *et al.*, 2007).

Outra forma de controle epigenético se dá pela atuação dos microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA que regulam negativamente a expressão do gene através da degradação de RNAm alvo ou inibem a tradução de proteína (BARTEL, 2004; ZHANG *et al.* 2007). Eles atuam na maquinaria epigenética em uma forma bidirecional, podendo ter como alvo moléculas-chaves das reações epigenéticas, mas sendo também suscetíveis à regulação epigenética (CHEN *et al.* 2013). Estudos sobre o perfil de miRNA nos tecidos gengivais têm demonstrado que vários miRNAs são diferencialmente expressos no tecido gengival inflamado e no saudável (XIE, 2011; LEE, 2011). Em estudos preliminares realizados por nosso grupo de pesquisa foi observado que o miR29b e o miR142-3p estão aumentados nos tecidos gengivais de indivíduos com PC comparada à gengiva saudável (ARÃO, 2015). Nas bases de dados sobre microRNAs (mirbases), pode-se verificar como possíveis alvos do miRNA 29b, as DNMTs 1, 3A,3B, assim como as metaloproteinases (MMP) -2 e MMP-9. Em relação ao miRNA 142-3p tem sido descrito uma relação com as MMP-2 e MMP-9, mas não com as DNMTs.

As metaloproteinases (MMPs) são uma família de endopeptidases Zn²⁺-dependente que promovem a degradação da matriz extracelular (MEC) (WOESSNER & NAGASE,2000). Na periodontite, há uma destruição da MEC nos tecidos periodontais pela atuação das MMPs (REYNOLDS & MEIKLE, 1997; COUSSENS, FINGLETON, & MATRISIAN, 2002). Recentemente, tem surgido interesse na regulação pós-transcricional das MMPs via miRNAs. A superexpressão das MMP-2 e MMP-9 foi observada nos tecidos gengivais de indivíduos com PC comparados aos pacientes saudáveis (LIU, CAO & ZHU,2017).

A avaliação dos miRNAs 29b e 142-3p e suas associações com o padrão de transcrição das DNMTs e da MMPs nos tecidos gengivais provenientes de indivíduos com PC e sem a doença poderão esclarecer importantes aspectos relacionados à patogênese da periodontite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal é uma doença infecciosa caracterizada pela inflamação dos tecidos de suporte dentário, o que pode levar à subsequente perda desses tecidos (PAGE, 1997). Quando a inflamação é reversível na gengiva denomina-se gengivite, e quando é uma condição inflamatória de todo o periodonto, com a destruição dos tecidos de sustentação e suporte dentário denomina-se periodontite (ARMITAGE, 1999).

Em 1999, a Academia Americana de Periodontia, classificou a periodontite dividindo-a em dois grupos principais, a periodontite crônica (PC) e a agressiva (PA). A PC é a forma de periodontite mais comum, ocorre em pacientes acima de 30 anos, mas pode ocorrer em qualquer faixa etária. Caracteriza-se em geral por uma progressão lenta à moderada; e presença de grande quantidade de irritantes locais que são compatíveis com o grau de destruição no periodonto (ARMITAGE, 1999). A PA geralmente acomete indivíduos jovens, é caracterizada pela progressão rápida e ausência de acúmulos de irritantes locais compatíveis com o grau de destruição observado e por uma história familiar da doença (ARMITAGE, 1999).

A PC possui etiologia primária de bactérias específicas, com predominância das bactérias anaeróbias Gram negativas (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994). Socransky *et al.* (1998) observaram associações entre 40 espécies bacterianas presentes na microbiota subgengival de indivíduos com PC, definindo assim cinco complexos bacterianos de acordo com as similaridades por pares e grupos de espécies. A presença do biofilme bacteriano possibilita a permanência dos patógenos nas superfícies dos dentes e no ambiente da bolsa periodontal (MARTINS, 1997).

A patogenia dessas periodontites implica em considerá-las infecções com uma microflora altamente virulenta e/ou um alto nível de susceptibilidade do hospedeiro. Essa susceptibilidade pode ser por fatores genéticos e ambientais inerentes ao hospedeiro (BORRELL *et al.*, 2005; TAKASHIBA *et al.*, 2006). Estudos demonstram que indivíduos com características clínicas e fatores de risco semelhantes respondem de forma diferente a um mesmo tratamento empregado, o que demonstra a importância dos componentes genéticos e epigenéticos do hospedeiro na etiopatogenia da doença (OFFENBACHER *et al.*, 2008).

2.2 MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Os mecanismos epigenéticos referem-se as mudanças na expressão dos genes, sem alterar a sequência de nucleotídeos do DNA (FEINBERG, 2008). Os eventos epigenéticos atuam de forma complexa, envolvendo os mecanismos de metilação do DNA, modificação de histonas e regulação gênica por RNAs não codificadores de proteínas (microRNA) (BAYARSAIHAN, 2011). Essas modificações podem ser hereditárias ou adquiridas ao longo da vida de um indivíduo, sendo influenciadas por diversos fatores como tabagismo (SMITH *et al.*, 2007), diabetes (DEVASKAR & THAMOTHARAN, 2007), idade (BENAYOUN *et al.*, 2015), obesidade (HERRERA *et al.*, 2011) e toxinas (EDWARDS & MYERS, 2007). O ponto crucial das alterações epigenéticas e suas relações com a patogênese das doenças crônicas inflamatórias é o fato de serem alterações potencialmente reversíveis, passíveis de propostas terapêuticas alternativas para as doenças (BAYARSAIHAN, 2011).

2.2.1 METILAÇÃO DO DNA

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético caracterizado pela adição de um grupo metil no carbono 5' do anel de citosina, que pode inibir a transcrição gênica (RICHARDSON, 2003; BAYLIN, 2005). A metilação do DNA consiste em uma modificação covalente do DNA no qual um agrupamento metil (CH₃) é transferido da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 5' de uma citosina que geralmente precede uma guanina conectados por uma ligação fosfodiéster (dinucleotídeo CpG). A adição do grupo metil em citosinas presentes em regiões ricas em citosina e guanina (ilhas CpG) são feitas por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT2, DNMT3A e DNMT3B) (Figura 1) (BAYLIN, 2005; ADCOCK *et al.*, 2007; JOHNSON & BELSHAW, 2008). DNMT1 é responsável por manter a metilação do DNA estabelecida durante a sua replicação. A DNMT2 participa no reconhecimento do dano, reparação de mutação e recombinação do DNA. As DNMT3A e B são mediadoras do estabelecimento de um novo padrão de metilação (FITZPATRICK & WILSON, 2003; BAYLIN, 2005; GOPISETTY *et al.*, 2006; RAMACHANDRAM & SINGAL, 2006).

Embora a metilação controle a atividade do gene, sozinha ela não é suficiente para inativar a transcrição. O processo de metilação do DNA e as modificações nas

histonas estão conectados. A acetilação de histonas trabalha em conjunto com a metilação para regular a transcrição do gene. As DNMTs regulam o silenciamento do gene recrutando proteínas aglutinadoras de metil que interagem com deacetilases de histonas (HDAC) (BAYLIN,200, WILSON, 2008). HDAC remove o grupo acetil das histonas levando à compactação da cromatina e impedindo a aglutinação dos fatores de transcrição (GOPISET, RAMACHANDRAM & SINGAL, 2006).

A indução da metilação por DNMTs pode ser influenciada por alguns fatores, como a inflamação crônica, agentes infecciosos e hábitos, como o tabagismo (BAYLIN, 2005). As presenças constantes de inflamação e de bactérias na periodontite suportam a hipótese de alteração do epigenoma na periodontite (ADCOCK *et al.*, 2007).

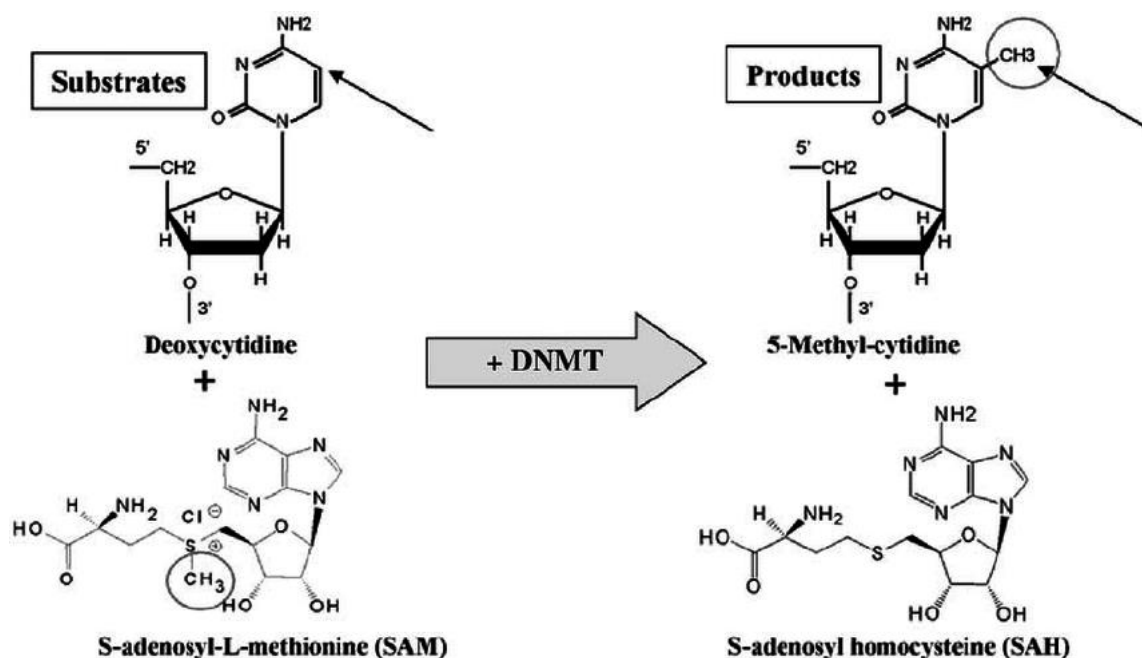


Figura 1 Esquema do processo de formação da 5-Metilcitosina (5-MeC) pela DNA metiltransferase (SULEWSKA, 2007)

As principais evidências das alterações epigenéticas na PC relacionam ao perfil de metilação em genes envolvidos com a resposta imune do hospedeiro (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; AMORMINO *et al.*, 2013, ZHANG *et al.*,2013; SOUZA *et al.* 2014). Os periodontopatógenos e suas interações com os eventos epigenéticos do hospedeiro têm sido avaliados. Pereira *et al.* (2013) verificaram que o lipopolissacarídeo (LPS) da *P.gingivalis* regula negativamente a expressão das

enzimas DNMT1, DNMT3A e JMJD3 nos ceratinócitos em paciente com PC. Miao *et al.* (2014) mostraram que culturas de células do ligamento periodontal tiveram o gene da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) hipometilado quando recebiam o estímulo do *T. denticola*.

2.2.2 MICRORNA

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA endógenos, não codificadores de proteínas, que exibem aproximadamente de 18 a 24 nucleotídeos. Os miRNAs regulam negativamente a expressão do gene através da degradação de RNAm alvo ou inibem a tradução de proteína (BARTEL, 2004). Estudos têm demonstrado que os miRNAs possuem importantes atividades biológicas devido a sua capacidade de regular em média 60% de todos os genes humanos, sendo que um único miRNA é capaz de regular vários genes (FRIEDMAN, 2009; HARFE, 2005; SAYED & ABDELLATIF, 2011).

Os miRNAs são transcritos inicialmente pela RNA polimerase II (pol II), formando os miRNAs primários (pri-miRNAs) que contém várias bases de nucleotídeos em seu comprimento. Esses pri-miRNAs possuem algumas estruturas em forma de alças que são clivadas ainda no núcleo celular pela enzima RNase III endonuclease (Drosha) e seu cofator DGCR8, liberando um miRNA precursor de 60-75 nucleotídeos (pre-miRNA) Os pré-miRNAs são então exportados do núcleo para o citoplasma pelo exportina 5 (XPO5) e Ran-GTP. No citoplasma, os pré-miRNAs são reconhecidos pela RNase III e DICER1 e geram miRNA maduro de fita dupla. Somente uma das fitas do miRNA maduros se liga ao complexo silenciador induzido por miRNA (miRISC), que contém DICER1, Argonauta AGO e miRNAs (LEE, 2004; SONTHEIMER, 2005; LIN & GREGORY, 2015) (Figura 2).

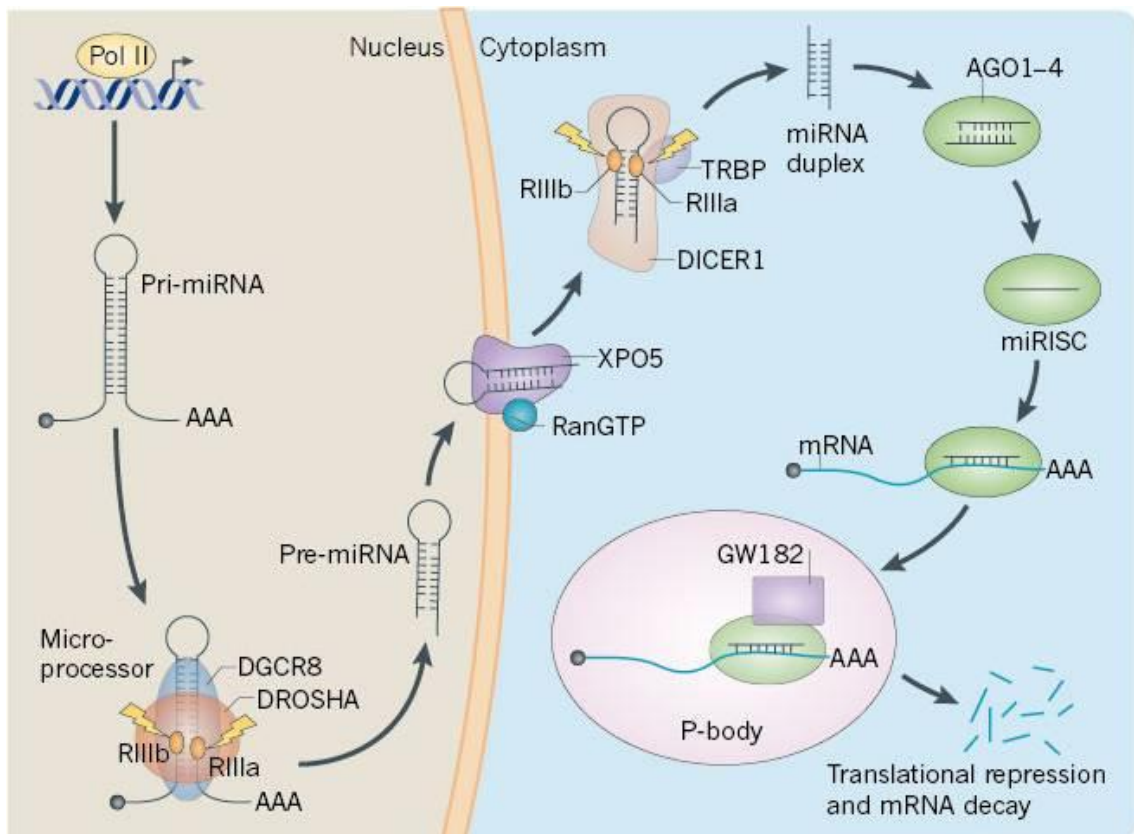


Figura 2 – Biogênese do microRNA (LIN & GREGORY, 2015)

A participação dos miRNAs nos mecanismos de inflamação e imunidade tem sido investigada, uma vez que representam um importante alvo para potenciais agentes diagnósticos e terapêuticos (SAYED & ABDELLATIF, 2011). Os miRNAs ativam ou inibem as funções de células imunes inatas, incluindo neutrófilos, células dendríticas e macrófagos, e/ou funções de células imunes adaptativas, incluindo células T e B (LUAN, 2018).

Dentre os miRNAs, destacam-se os miRNAs 142-3p e o miRNA-29b, alvos do presente trabalho. O miRNA 142-3p tem habilidade de regular apoptoses em diferentes tipos celulares, tais como miócitos cardíacos (SHARMA *et al.*, 2012), macrófagos associados a tumores (XU *et al.*, 2014), células cancerígenas (XIAO & LIU, *et al.*, 2015) e células epiteliais gengivais (LI, 2017). O miR-29b geralmente é reconhecido como um regulador fundamental na metástase e quimiorresistência do câncer (RU *et al.*, 2012; DAI *et al.* 2013)

Na doença periodontal, os miRNAs: miR-142-3p, miR-146a, miRNA-155, miR-203 e miR-223 têm sido propostos como marcadores para doença,

independentemente de suas funções biológicas (SCHMALZ *et al.*, 2016). Os miRNAs miR-15a, miR-29b, miR-125a, miR-146a, miR-148 / 148a tiveram sua expressão aumentada na presença de doença periodontal em biópsias gengivais em modelo humano e animal (LUAN *et al.*, 2018). Perri *et al.* (2012) ao analisarem biópsias de tecido gengival detectaram que o miR142-3p estava aumentado na presença de doença periodontal e obesidade. Esses estudos sugerem que os miRNAs podem estar relacionados com a patogênese da doença periodontal. Os miRNA 142-3p e miRNA 29b podem modular a resposta específica dos macrófagos após a exposição ao LPS (NAQVI *et al.*, 2014, FORDHAM, NAQVI & NARES, 2015). Kanaan *et al.* (2012) observaram que o LPS de *K. pneumoniae* aumentava a expressão miRNA142-3p em células exsudadas peritoneais. SUN *et al.* (2011) demonstraram que o miRNA 142-3p desempenha papel importante na regulação da produção da citocina IL-6 nas células dendríticas, após estímulo com LPS de *S. enteritidis*.

Os miRNAs que afetam os mecanismos epigenéticos são chamados epi-microRNAs. O estudo pioneiro que relata a existência de epi-microRNAs foi realizado por Fabbri *et al.* (2007). Neste estudo, verificou-se que a família do miRNA-29 regula negativamente os níveis da DNMT-3A e DNMT-3B nas células do câncer de pulmão, gerando uma hipometilação do DNA (FABBRI *et al.*, 2007; VASILATOU *et al.*, 2013). A superexpressão do miRNA-29b tem sido relacionada à redução significativa da expressão DNMT1 em células T CD4 + nos lúpus sistêmicos (QIN *et al.*, 2013). Em um estudo *in vitro* foi descrito que, em macrófagos estimulados com o LPS da bactéria periodontopatogênica *P. gingivalis*, os miRNA 29-b estavam aumentados comparados aos não estimulados (NAQVI, *et al.*, 2014). Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram uma correlação negativa entre o miRNA-148a e a DNMT3B nos tecidos gengivais saudáveis (MOREIRA, 2017). Contudo, não há trabalhos na literatura sobre a relação entre os miRNAs 29b e 142-3p com as DNMTs na PC.

2.3 METALOPROTEINASES

As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma família de proteases dependentes de zinco e cálcio que desempenham um papel de degradação e remodelação da matriz durante diferentes processos fisiológicos ou patológicos

(BIRKEDAL *et al.*,1993). As MMPs compreendem quatro subclasses, sendo classificadas com base em sua especificidade de substrato e homologia de sequência. Colagenases como MMP-1 são ativas contra o colágeno fibrilar. As Gelatinases (MMP-2, MMP-9) apresentam alta atividade contra colágenos desnaturados. As Estromelinas degradam os componentes não colagenosos da MEC e as MMPs do tipo membrana. A Gelatinase A 72 kDa (MMP-2) é mais difundida em fibroblastos, endoteliócitos, macrófagos e células tumorais malignas enquanto a Gelatinase B 92 kDa (MMP-9) é mais expressa em queratinócitos, osteoclastos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos (MAKELA *et al.* 1994; VISSE & NAGASE, 2003; SORSA *et al.*, 2006).

A MEC e a membrana basal são as principais barreiras que protegem os tecidos periodontais da inflamação. Na inflamação periodontal, as células residentes no periodonto como: fibroblastos, macrófagos/ monócitos e células epiteliais são ativadas para produzir citocinas e MMPs (SORSA *et al.*, 2006). Na periodontite, é observado uma destruição da MEC nos tecidos periodontais (REYNOLDS & MEIKLE, 1997). As MMPs podem promover a ocorrência e desenvolvimento de periodontite degradando as proteínas da MEC (COUSSENS, FINGLETON, & MATRISIAN, 2002). Estudos sobre a expressão das MMPs nos tecidos gengivais detectaram um aumento nos níveis das MMPs na doença periodontal (INGMAN *et al.*, 1994; BILDT *et al.*, 2008; LIU, CAO & ZHU,2017).

Um dos mecanismos regulatórios da expressão das MMPs tem sido descrito pela regulação pós-transcricional via miRNAs. Wang *et al.* (2015) verificaram que o miRNA-29b regula negativamente a transcrição de MMP2 inibindo o crescimento e as metástases de células do câncer de pulmão *in vitro* e *in vivo*. Chen (2011) observou que o miRNA-29b regula negativamente a transcrição de MMP-9 em doenças cardiovasculares. O miRNA 142-3p regula negativamente as MMP-2 e MMP-9 em osteosarcoma e gliomas (ZHENG ,2014; QIN, 2017). Não há estudos descritos correlacionando miRNAs e MMPs na PC.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a transcrição dos microRNAs 29-b e 142-3p, DNMTs e MMPs na periodontite crônica

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a transcrição do miRNA 29b e do miRNA 142-3p nos tecidos gengivais de indivíduos com periodontite crônica e sem a doença.
- Avaliar a transcrição das DNMT-1, DNMT-3A e DNMT-3B nos tecidos gengivais de indivíduos com periodontite crônica e sem a doença.
- Avaliar a transcrição das MMP-2 e MMP-9 nos tecidos gengivais de indivíduos com periodontite crônica e sem a doença.
- Correlacionar a transcrição das DNMT-1, DNMT-3A e DNMT-3B com os miRNAs 29b e miRNAs 142-3p nas amostras estudadas.
- Correlacionar a transcrição das MMP-2 e MMP-9 como os miRNAs 29b e miRNAs 142-3p nas amostras estudadas.
- Correlacionar os transcritos dos miRNAs, DNMTs e MMPs com os parâmetros clínicos de gravidade da doença.

4 METODOLOGIA

4.1 Considerações Éticas

Este projeto faz parte da linha de pesquisa denominada “Avaliação de alterações epigenéticas na periodontite crônica”, que foi submetido ao Comitê de ética em pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovado sob o número CAAE nº01311912.9.0000.5149. As amostras foram coletadas na Clínica Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG e no Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas Gerais (IPSEMG).

Todos os participantes foram devidamente informados sobre os métodos e objetivos da pesquisa, sendo incluídas apenas amostras de indivíduos que autorizaram sua participação mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A e B). Um questionário foi aplicado a todos os indivíduos para obter informações sobre os fatores de risco para a doença periodontal, sendo incluídos no estudo somente aqueles sistemicamente saudáveis com exceção da doença periodontal.

4.2 Seleção do grupo amostral

Durante a anamnese foi realizado o preenchimento da ficha clínica e do periodontograma (Apêndice A e B). No exame clínico foram avaliados os parâmetros periodontais de sangramento à sondagem (SS), nível de inserção clínica (NIC) e profundidade de sondagem (PS). A sondagem com sonda milimetrada foi realizada percorrendo todo sulco gengival, na superfície vestibular, mesial, distal e lingual/palatina de todos os dentes presentes.

Os indivíduos que relataram uso de antibióticos ou anti-inflamatório nos últimos 6 meses; uso contínuo de medicamentos que apresentam associação com crescimento gengival; portadores de diabetes; osteoporose; doenças inflamatórias crônicas, com exceção da PC; fumantes; grávidas ou lactantes foram excluídos.

O grupo doente foi caracterizado por indivíduos com PC que apresentavam sangramento à sondagem, quatro ou mais dentes com um ou mais sítios com PS>3

mm e NIC \geq 4 mm (LOPEZ *et al.*, 2002; ARMITAGE, 1999). As amostras de fragmentos gengivais foram coletadas durante cirurgia para a raspagem em campo aberto e, exodontias de dentes com prognóstico periodontal desfavorável. O grupo controle (C) foi formado por indivíduos sem evidência clínica de inflamação gengival. Foram coletadas amostras de tecido gengival em sítios com ausência de sangramento a sondagem, PS menor ou igual a 3 mm e NIC menor ou igual a 3 mm. O material deste grupo foi coletado de áreas adjacentes a dentes indicados para extração, ou na região contralateral de sítios com indicação de aumento de coroa clínica em dentes, no qual não apresentavam alteração de profundidade de sondagem no sítio selecionado para coleta.

Os grupos de estudo foram constituídos por 17 indivíduos com PC e 17 indivíduos C. Os tecidos gengivais foram coletados e armazenados em RNA Holder e Formaldeído 10 % e estocados à -80°C até o seu processamento.

Os indivíduos incluídos no presente trabalho foram classificados quanto à condição periodontal baseado nos critérios de classificação da Academia Americana de Periodontia de 1999; classificação vigente na época de coleta das amostras (ARMITAGE, 1999). A proposta de uma nova classificação das doenças periodontais foi discutida no *World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions* em 2017 e publicada recentemente como *Proceedings do Workshop Mundial* (CATON *et al.*, 2018). Na classificação recente, a terminologia da forma clínica PC foi extinta e a periodontite foi classificada de acordo com seu estágio e seu grau. A classificação dos estágios está relacionada com a gravidade da doença, avaliada primariamente pela perda de inserção clínica, dentre outros. Já o grau da doença reflete as evidências, ou o risco, de progressão da doença e seus efeitos na saúde sistêmica. O grau pode ser modificado pela presença de fatores de risco à doença. Em uma análise preliminar, baseada na atual classificação, o grupo amostral doente do presente trabalho se enquadraria nos critérios de periodontite, estágio III, grau B. No entanto, uma verificação mais detalhada dos dados clínicos dos pacientes se faz necessária para contemplar todos os critérios da classificação recente.

4.3 Avaliação Histológica

As amostras armazenadas em Formaldeído 10% foram submetidas à avaliação histológica para a melhor caracterização dos grupos amostrais. Foram incluídos no grupo C, os indivíduos classificados como portadores de gengiva saudável clinicamente e que na análise histológica exibiam um escasso infiltrado inflamatório na sua lâmina própria. No grupo PC, além de respeitarem todos os critérios de classificação clínica para PC, em sua análise histológica apresentaram um intenso infiltrado inflamatório.

4.4. Avaliação do miRNA-29b e do miRNA 142-3p

4.4.1 Extração do RNA Total e conversão em cDNA

Os fragmentos de tecido gengival acondicionados em RNA Holder foram submetidos à extração do RNA Total pelo método do Trizol, segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Denovix (DS-11) com pureza considerada entre 1,9 a 2,0 (BANDRÉS *et al.* 2006). A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese por meio de gel de poliacrilamida 15%, utilizando 1µg de RNA extraído, revelado em solução brometo de etídio e analisado em transluminador de UV.

O RNA total foi convertido em cDNA por RT *primers* específicos (*TaqMan MicroRNA RT, Applied Biosystems Foster City, CA*). Para cada reação foram usados 0,15 µL de dNTP; 1,0 µL de enzima transcriptase reversa (RT enzima); 1,5 µL de tampão; 0,19 µL de inibidor de RNase; 4,16 µL de água livre de RNase e 3,0 µL *primer* de transcrição reversa (RT primer) que é específico para cada alvo. Foi adicionado 5µL de amostra de RNA (100 ng de RNA total) ao 10 µL do mix, obtendo um volume final de 15 µL. As reações foram realizadas em termociclador CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad *Laboratories, USA*) sob as condições de 16°C por 30 minutos (desnaturação), 42°C por 30 minutos (anelamento *primer*), 85°C por 5 minutos (extensão). Através dessa técnica foi possível a conversão somente do fragmento correspondente ao miRNA de interesse. Foram avaliados os miRNA-29b e miRNA

142-3p e o endógeno RNU48, como controle das reações. Esse método se baseia na utilização de um *primer* com estrutura do tipo *stem-loop*. O *stem-loop* do *primer* possui uma especificidade apenas para o miRNA maduro alvo, permitindo a formação de uma junção *primer-miRNA* que se estende até a extremidade 5' do miRNA. Esse processo resulta em um *amplicon* maior, permitindo o uso de um método de detecção *TaqMan Assay*TM para quantificar a expressão do miRNA por qPCR. (Figura 3). Os experimentos foram realizados em duplicata.

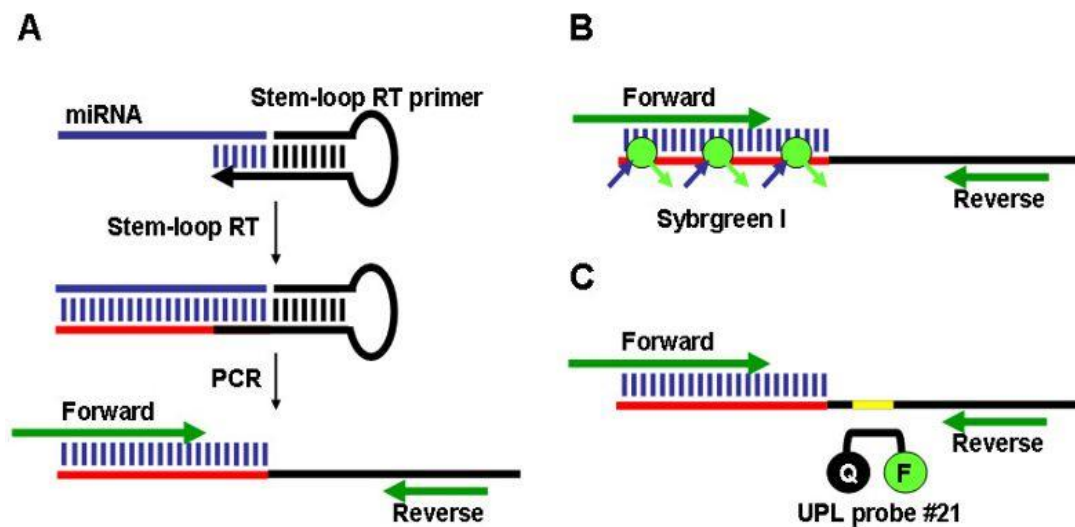


Figura 3 – Stem-loop RT-PCR miRNA assays. (VARKONYI, 2007)

4.5 Avaliação das DNMT 1, DNMT 3a, DNMT3b e MMP-2, MMP9

4.5.1 Extração do RNA total e conversão em cDNA.

Nos fragmentos de tecido gengival acondicionados em RNA Holder foram extraídos o RNA total, segundo o protocolo recomendado pelo fabricante do reagente TRIzol, sendo as alíquotas de RNA extraído armazenadas a -80°C. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Denovix (DS-11) cuja pureza foi considerada entre 1,9 a 2,0 (BANDRÉS *et al.* 2006).

Após extração do RNA Total, inicialmente as amostras de RNA total foram tratadas com DNase I®, *Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* para eliminar possível contaminação por DNA genômico (*Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA*). Uma vez tratadas, as amostras foram submetidas à síntese de

cDNA utilizando o *kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Life Technologies Inc. Carlsbad, CA, USA), utilizando 8 µL de RNA que corresponde a aproximadamente 1,5 µg do mesmo, seguindo conversão conforme as orientações do protocolo proposto pelo fabricante. O cDNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Denovix (DS-11) e armazenado a -20°C.

4.6- Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

Tanto a avaliação dos miRNAs de interesse quanto das DNMTs e das MMPs foram realizadas por qPCR pelo método de detecção *TaqMan*. Todas as reações foram realizadas em termociclador CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, USA). Foram usados 500 ng de cDNA, *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e primers específicos para cada alvo. Utilizou-se o endógeno b-actina nas reações das MMPs e DNMTs; e o endógeno RNU48 nas reações dos miRNAs. Os resultados da transcrição do gene alvo foram calculados e normalizados com o endógeno e relativo a uma amostra calibradora, que foi formada por um pool de amostras de sangue de indivíduos saudáveis. Cada reação conteve 18 µL de mix, 10 µL de *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 7 µL de água e 1 µL *Assay* (*primer* e sonda) dispensado em cada poço da placa. Em seguida, 2 µL do cDNA de cada amostra foi adicionado, totalizando volume final de reação de 20 µL. As reações foram realizadas nas condições de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C por 40 ciclos. A análise dos dados foi realizada pelo método 2- $\Delta\Delta C_t$ (Livak e Schmittgen, 2001) e padronizada por transformação logarítmica, centralização de médias e escalonamento automático, conforme descrito anteriormente (WILLEMS *et al.*, 2008). Todo o estudo foi realizado em duplicata.

4.7- Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5 (Software GraphPad, La Jolla, CA). Os testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov, Mann-Whitney e a Correlação de Spearman foram aplicados quando apropriados. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1. Dados clínicos, demográficos e histológico

Os dados clínicos e demográficos dos grupos de estudo estão descritos na Tabela 1.

Na avaliação histológica para a caracterização amostral, um maior número de células inflamatórias foi observado no grupo PC comparado ao grupo C ($p=0,0001$). O infiltrado inflamatório era difuso e com predomínio de células mononucleares em ambos os grupos.

| | <i>Periodontite Crônica n=17</i> | <i>Controle n=17</i> |
|--|--|--------------------------|
| <i>Idade média (máx – min) *</i> | 45 (27-75) | 37 (18-56) |
| <i>Gênero Feminino (%)</i> | 9 (52,94 %) | 10 (58,82 %) |
| <i>Masculino (%)</i> | 8 (47,06 %) | 7 (41,18 %) |
| <i>Profundidade a sondagem (mm) Média ±DP</i> | 8,5±2,95 | 1,1±0,31 |
| <i>Nível de Inserção Clínica (mm) Média±DP</i> | 10,1±3,47 | 1,5±0,70 |

Tabela 1- Características dos grupos de estudo. * $p<0,05$

5.2. miRNA 29b e miRNA 142-3p

O grupo PC apresentou maiores níveis do miRNA 29b (Gráfico 1A) e do miRNA 142-3p (Gráfico 1B) comparado ao grupo C.

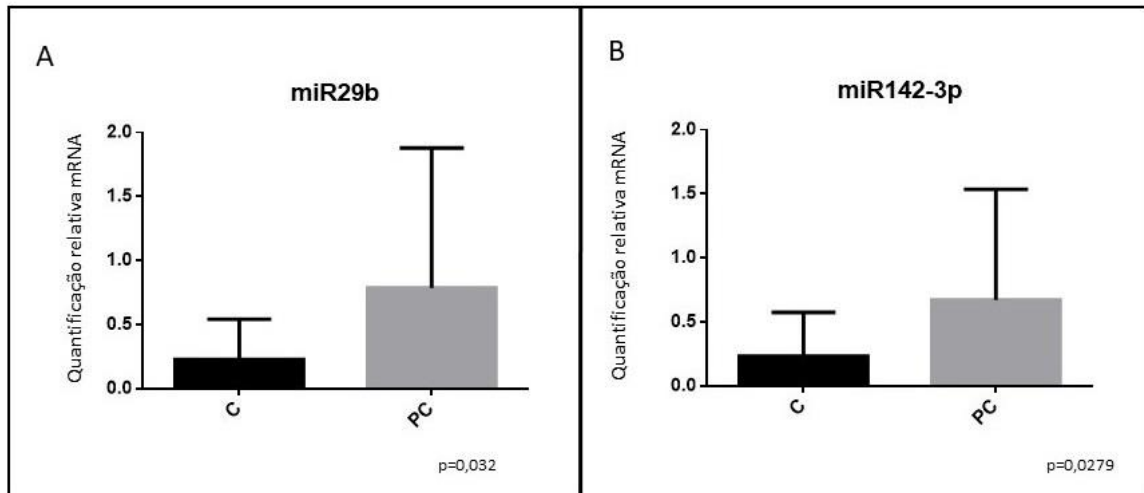


Gráfico 1 - Quantificação relativa média do miR142-3p (A) e miRNA 29b (B) nos grupos PC (n=17) e C (n=17) (p<0.05 Teste Mann-Whitney).

5.3 DNMTs

5.3.1 DNMT 1

O grupo PC apresentou menores níveis de transcritos de DNMT1 em comparação ao grupo C (Gráfico 2).

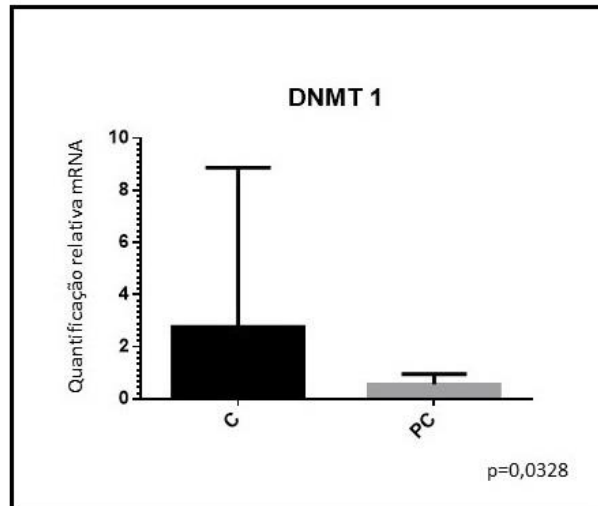


Gráfico 2 - Quantificação relativa média (RQ) do DNMT1 nos grupos PC (n=17) e C (n=17) ($p < 0.05$ Teste Mann-Whitney).

5.3.2 DNMT 3A e DNMT 3B

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de transcrição dos genes DNMT3A e DNMT3B (Gráfico 3)

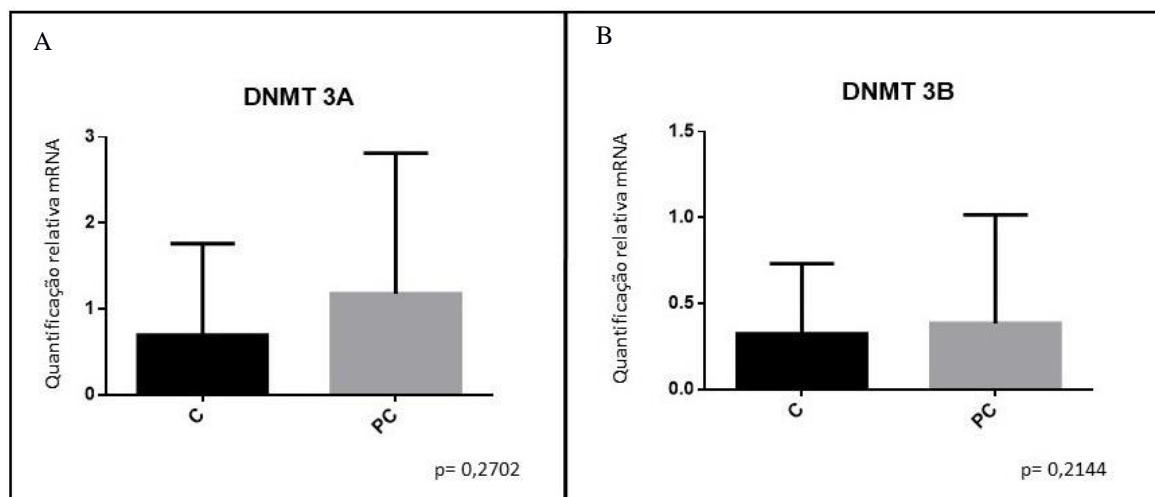


Gráfico 3- Quantificação relativa média (RQ) do DNMT3a e DNMT3b nos grupos PC (n=17) e C (n=17) ($p < 0.05$ Teste Mann-Whitney).

5.4 MMP-2 e MMP-9

O grupo PC apresentou maiores níveis de transcritos da MMP-2 (Gráfico 4A) em comparação ao grupo C. Não foi observada diferença significativa em relação aos níveis de transcrição do gene MMP-9 entre os grupos (Gráfico 4B).

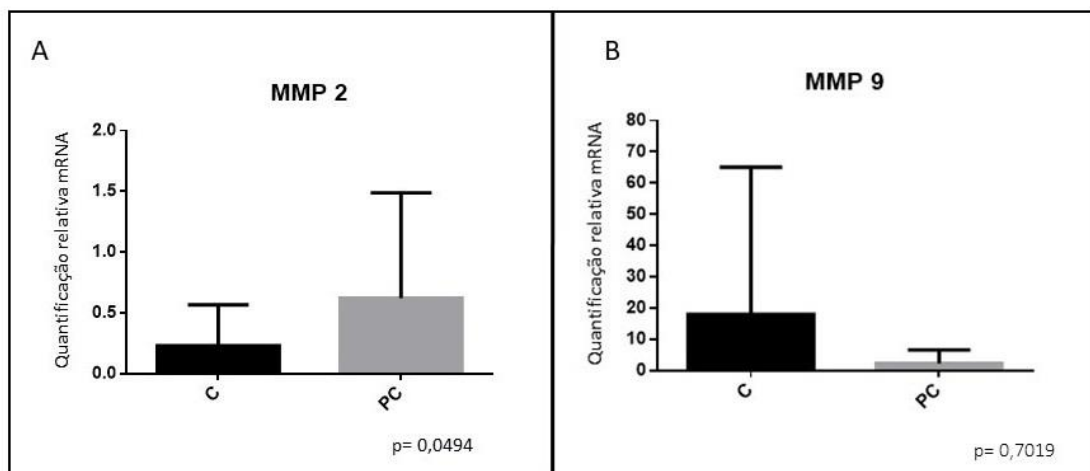


Gráfico 4 - Quantificação relativa média das MMP-2 (A) e MMP-9 (B) nos grupos PC (n=17) e C (n=17) ($p < 0.05$ Teste Mann-Whitney).

5.5 Correlações entre os miRNAs e as DNMTs

5.5.1. miRNA 29b versus DNMTs

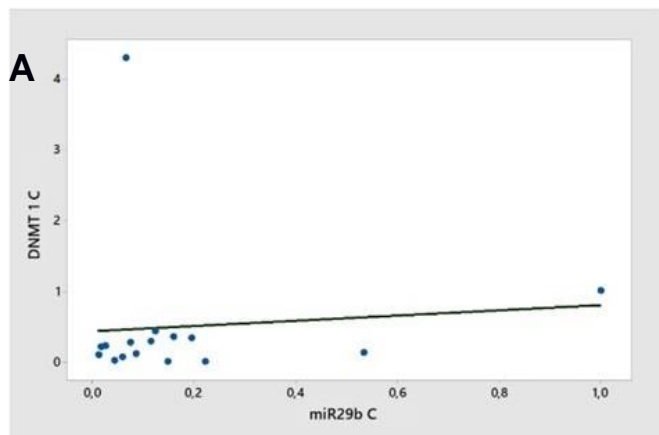
Não foram observadas correlações significativas entre o miRNA-29b e as DNMTs 1, 3A e 3B tanto no grupo PC (Gráfico 5 A, C e E) quanto no grupo C (Gráfico 5 B, D e F).

miRNA 29b versus DNMTs

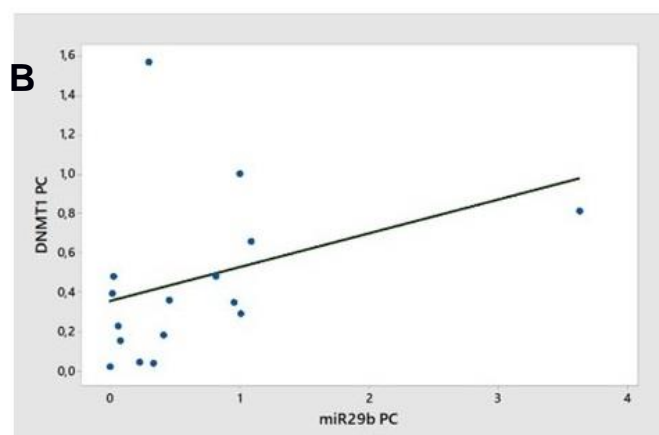
Grupo C

Grupo PC

DNMT 1

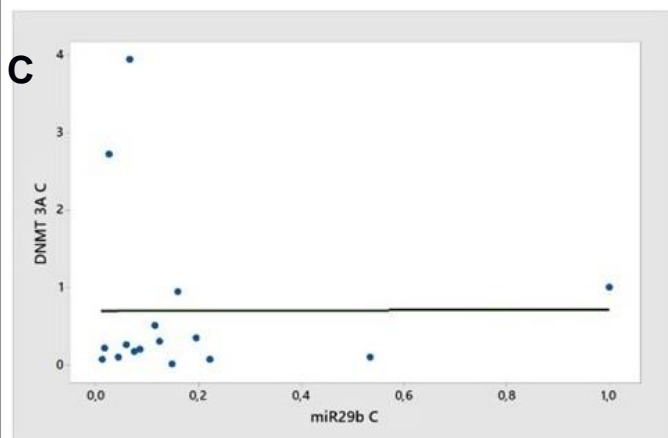


$p = 0.2253$; $r = 0.3104$

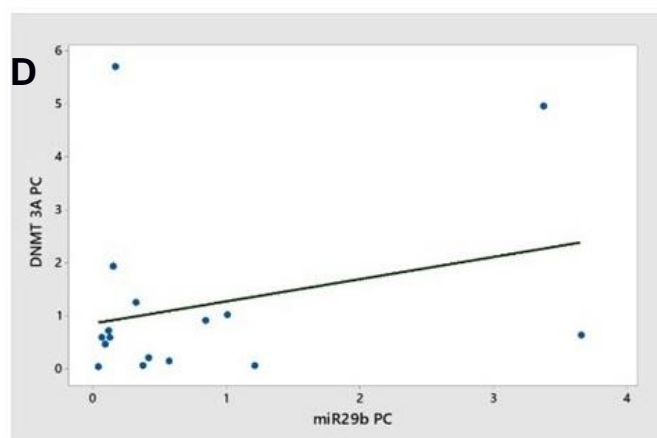


$p = 0.4647$; $r = 0.1902$

DNMT 3A

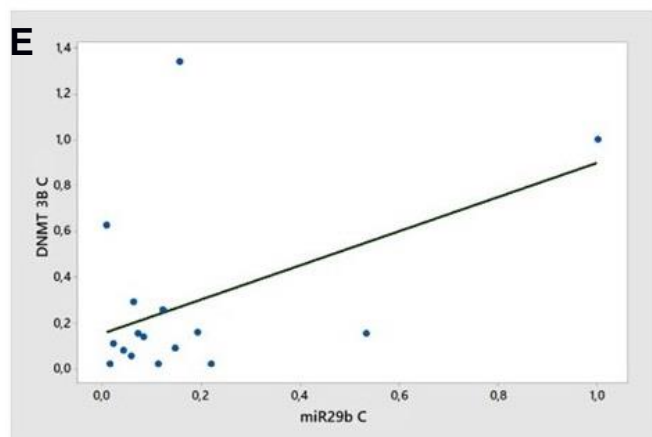


$p = 0.7113$; $r = 0.09693$

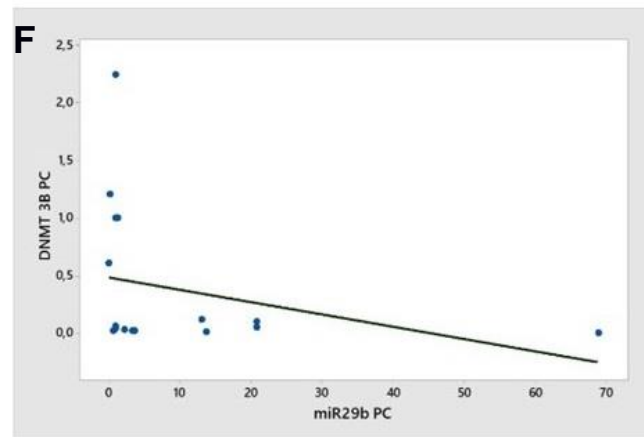


$p = 0.4302$; $r = 0.2049$

DNMT 3B



$p = 0.1753$; $r = 0.3448$



$p = 0.0546$; $r = -0.4705$

Gráfico 5 - Correlações entre o miRNA 29b e as DNMTs nos grupos PC (n=17) e C (n=17)

(Spearman)

5.5.2. miRNA 142-3p versus DNMTs

No grupo PC, foi observada correlação positiva entre o miRNA 142-3p e a DNMT1 (Gráfico 6A). No grupo C, foi observada correlação positiva entre os níveis de transcritos do miRNA 142-3p e da DNMT3B (Gráfico 6F). Não foram observadas outras correlações significativas entre o miRNA-142-3p e as DNMTs tanto no grupo PC (Gráfico 6 C e E) quanto no grupo C (Gráfico 6 B e D).

5.6 Correlação entre os miRNAs e as MMPs

5.6.1 miRNA 29b versus MMPs

No grupo PC, foi observada uma correlação negativa entre os níveis de transcritos do miRNA-29b e da MMP-2 (Gráfico 7A). Não foram observadas correlações significativas tanto no grupo PC quanto no grupo C (Gráfico 7B, C, D).

5.6.2 miRNA 142-3p versus MMPs

No grupo PC foi observada uma correlação negativa com a MMP-2 (Gráfico 8A) e não houve correlação significativa com a MMP-9 (Gráfico 8C). No grupo C foi observada uma correlação positiva com a MMP-2 (Gráfico 8B) e com a MMP-9 (Gráfico 8D).

5.7 Correlações com dados clínicos

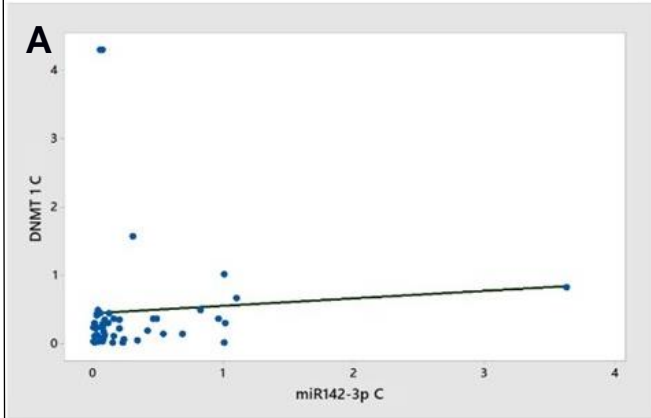
Não foram observadas correlações estatisticamente significativas considerando as variáveis miRNAs, DNMTs, MMPs com os índices de profundidade de sondagem e nível de inserção clínica do grupo PC (dados não mostrados).

miRNA 142-3p versus DNMTs

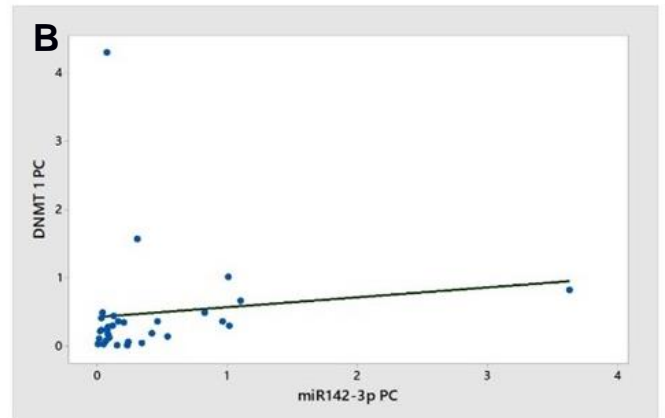
Grupo C

Grupo PC

DNMT 1

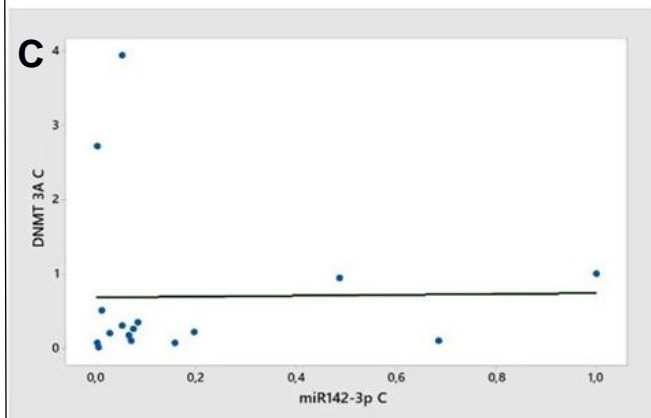


$p=0.1205$; $r = 0.2801$

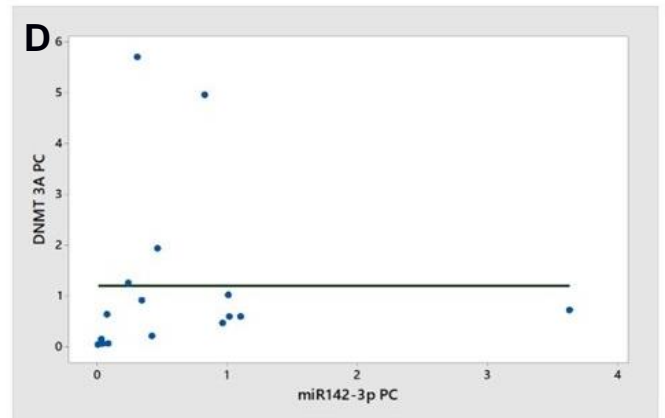


$p= 0.0253$; $r = 0.3949$

DNMT 3A

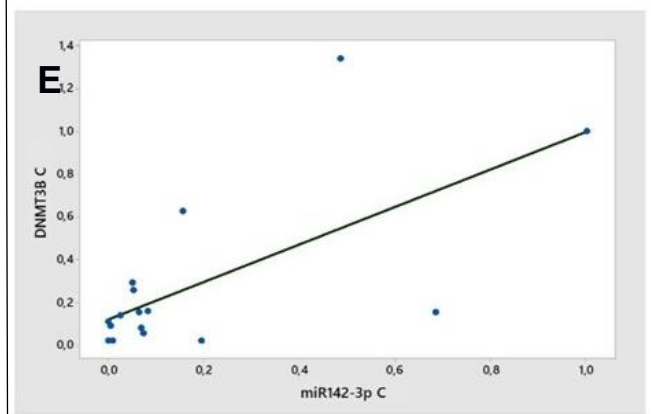


$p=0.4530$; $r = 0.1951$

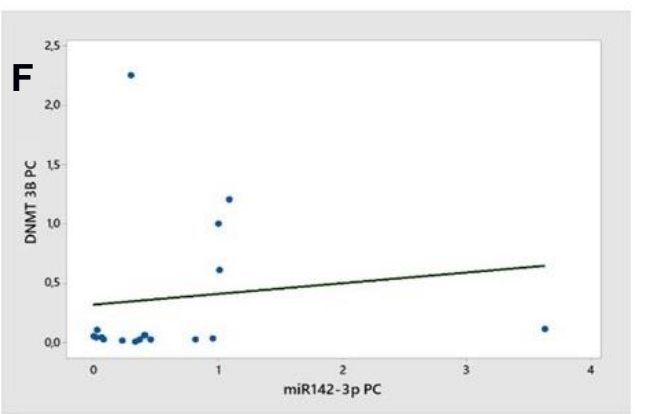


$p=0.1128$; $r = 0.3988$

DNMT 3B



$p=0.0097$, $r = 0.6074$



$p=0.0990$; $r = 0.4135$

Gráfico 6 - Correlações entre o miRNA 142-3p e as DNMTs nos grupos PC (n=17) e C (n=17) (Spearman)

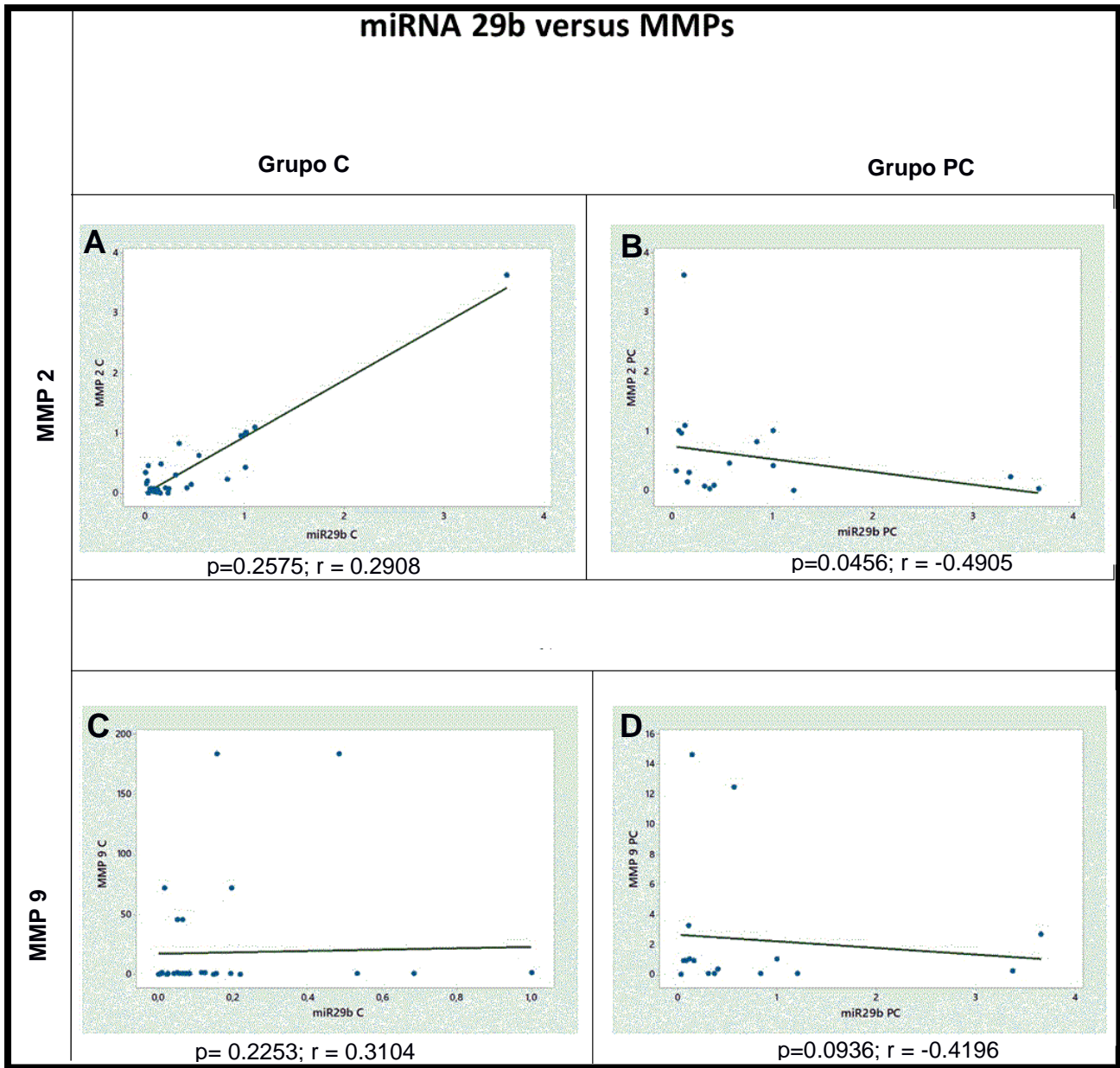


Gráfico 7 - Correlação entre miRNA 29b e MMPs nos grupos PC (n=17) e C (n=17) (Spearman)

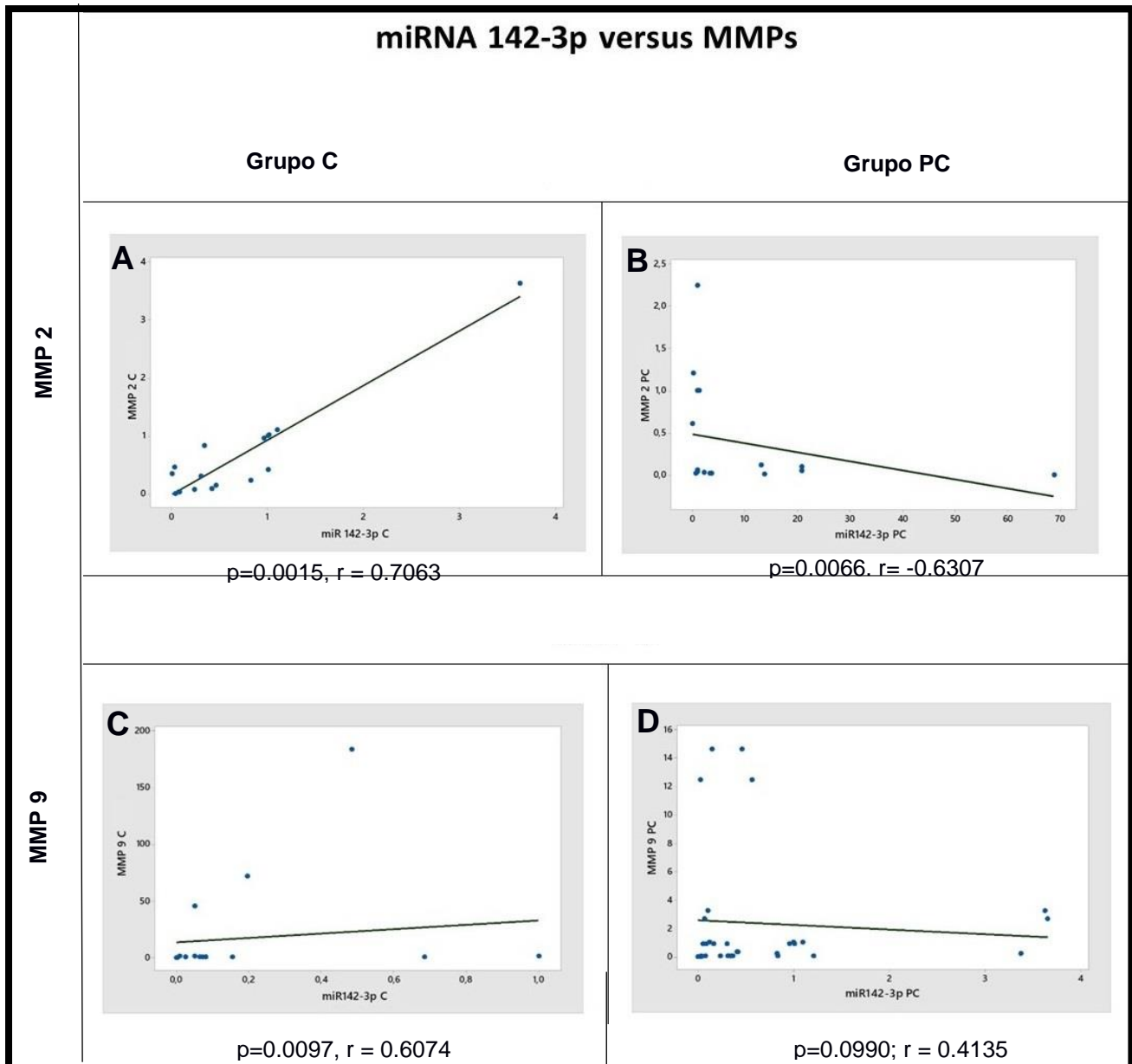


Gráfico 8--Correlação entre miRNA 142-3p e MMPs nos grupos PC (n=17) e C (n=17) (Spearman).

5.8 Resumo dos resultados

Os resultados estatisticamente significativos foram esquematizados na Figura 5.

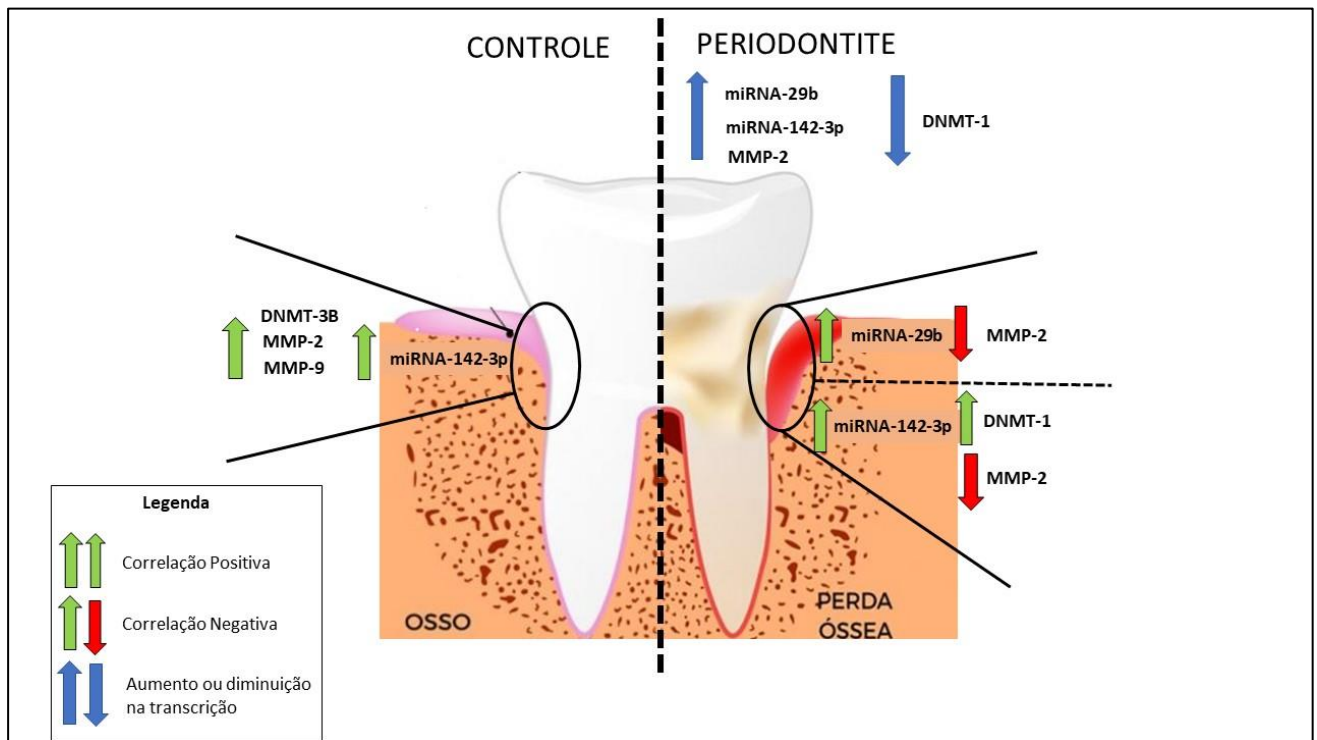


Figura 5 -Representação esquemática dos resultados estatisticamente significativos (Fonte: <http://www.odontosante.com.br/especialidades/periodontia-> Modificada)

6 DISCUSSÃO

O modo como o sistema imune do hospedeiro responde aos estímulos periodontopatogênicos tem sido amplamente estudado com o intuito de elucidar a patogênese da periodontite. Fatores envolvidos com a regulação gênica do hospedeiro tem sido alvo de estudos e podem interferir na predisposição ao aparecimento dos sinais e sintomas da doença. Diversas doenças crônicas têm sido associadas a alterações nos níveis de transcrição dos miRNAs (ALEXANDER & O'CONNELL, 2015). Os miRNAs estão desregulados em doenças infecciosas (EULALIO, SCHULTE & VOGEL, 2012), doenças inflamatórias crônicas (ALEXANDER & O'CONNELL, 2015), doenças autoimunes (PAULEY, CHA & CHAN, 2009), doenças cardiovasculares (MAEGDEFESSEL, 2014). No entanto, os estudos dos miRNAs na periodontite ainda são incipientes (SCHMALZ *et al.*, 2016; LUAN *et al.*, 2018).

Em um estudo piloto realizado por nosso grupo de pesquisa, 84 miRNAs foram avaliados por *array* nos tecidos gengivais de indivíduos com PC e sem a doença. Dentre outros miRNAs, os miRNAs 142-3p e 29b mostraram-se aumentados em cerca de 2 vezes nos doentes em relação ao grupo saudável. Esses resultados preliminares sugeriram uma possível participação dos miRNAs miR142-3p e miR-29b na patogênese da PC como reguladores epigenéticos da doença (ARÃO, 2015). No presente trabalho, foi avaliada a transcrição dos miRNA 142-3p e miRNA 29b através de ensaios individuais em um número amostral maior. Maiores níveis dos miR142-3p e miR-29b foram detectados no grupo PC em comparação ao grupo controle, confirmando os dados previamente obtidos. Esses resultados corroboram com os achados de Xie (2011) e Luan *et al.* (2018), os quais observaram um aumento significativo dos miR29b e miR142-3p em tecidos gengivais inflamados.

A partir dos resultados obtidos no estudo piloto, foram realizadas buscas nas bases de dados sobre microRNAs (miRBases) e na literatura para propor um possível alvo direto dos miR29b e miR142-3p que pudessem ter relação com a periodontite. Nas miRbases TargetScan (www.targetscan.org), PicTar (www.pictar.org) e miRanda (www.microrna.org) pode-se verificar como possíveis alvos do miRNA-29b, as DNMTs 1, 3A e 3B, assim como as MMP-2 e MMP-9; confirmando também suas relações na

literatura (XIE ,2011, LEE ,2011; CHEN *et al.*, 2011; MASOUMEH *et al.*, 2014, NAQVI, *et al.*, 2014). Em relação ao miRNA 142-3p, foi descrito na literatura uma relação com as MMP-2 e MMP-9 (ZHENG, 2014; QIN, 2017), e com DNMT1 (YANG *et al.*, 2018). No entanto, não foram encontrados possíveis alvos diretos relacionado a esses miRNAs nas miRBases.

A partir da identificação dos possíveis alvos dos miR142-3p e miR-29b, a avaliação da expressão das DNMTs e MMPs foi investigada nos grupos de estudo. Em relação às DNMTs, uma diminuição na transcrição da DNMT 1 foi observada no grupo PC comparado ao grupo controle. Na PC, a presença das bactérias e a liberação de produtos biologicamente ativos, como lipopolissacarídeos (LPS) podem alterar a expressão de alguns genes (OFFENBACKER, 1996). Yin & Chung (2011) e Pereira *et al.* (2013) observaram que o LPS de *P. gingivalis* pode causar uma diminuição na expressão do gene DNMT1 em células epiteliais orais. Além disso, esses autores também demonstraram que *P. gingivalis* pode modular o *status* de metilação do DNA dos genes envolvidos na resposta imune do hospedeiro na periodontite. A diminuição da transcrição da DNMT1 observada no grupo PC pode ser um mecanismo regulatório da doença para gerar um perfil hipometilado no DNA, o que poderia implicar em um aumento transcricional dos genes de interesse. Considerando as DNMT3 A e B, não foram encontradas diferenças na transcrição desses genes nos grupos avaliados. Esses dados são corroborados com os de Pereira *et al.* (2013) que também não verificaram diferenças nos níveis de transcrição da DNMT3A em amostras de biópsias gengivais de indivíduos com e sem periodontite. Até o presente momento não existem estudos descritos que avaliaram os níveis de transcrição da DNMT3B na periodontite. Na inflamação, as células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, induzem a formação oxigênio reativos e nitrogênio que podem levar danos ao DNA. Esse dano pode causar alterações no reconhecimento do DNA pelas DNMTs e alterar o padrão de metilação (VALINLUCK *et al.*, 2006). Estudos adicionais são necessários para elucidar o papel das DNMTs onde apresentam ter mecanismo de “feedback” na presença dos produtos da inflamação.

Em relação às MMPs, observou-se um aumento nos níveis da transcrição da MMP-2 nos tecidos gengivais de indivíduos com PC comparados aos pacientes saudáveis. Esse achado está de acordo com Baeza (2016) e Liu, Cao & Zhu (2017). No entanto, não foi observado nenhuma diferença nos níveis de transcrição da MMP-9, como observado por Gonçalves (2008) e Li *et al.* (2018) na doença periodontal. As MMPs 2 e 9 atuam em colágeno tipo IV e outros componentes da MEC do periodonto; estão envolvidas no

turnover fisiológico da MEC do periodonto (SODEK & OVERALL, 1992, RYAN *et al.*, 1996). Na periodontite, a natureza cíclica da perda de inserção periodontal, associa-se à ativação súbita de enzimas latentes armazenadas na MEC, que leva ao aumento da síntese e/ou sua liberação para os sítios de inflamação, levando a uma quebra súbita e extensa da rede de fibras colágenas, de acordo com o modelo proposto por Van der Zee *et al.* (1997). Um aumento tanto da MMPs 2 quanto da 9 nos tecidos gengivais inflamados foi descrito por alguns autores, assim como sua expressão e ativação aumentada com a progressão do processo inflamatório (BILDT *et al.*, 2008; HERNÁNDEZ RÍOS *et al.*, 2009; LEPPILAHTI *et al.*, 2014). Além disso, os níveis de MMP-9 estão relacionados à degranulação de neutrófilos induzida por citocinas e fatores de virulência bacteriana na doença periodontal (DING, *et al.* 1993, MIAO *et al.* 2014). No grupo amostral do presente trabalho, por questões éticas, os tecidos gengivais foram coletados dos pacientes após a terapia periodontal básica, na qual ocorre a remoção dos depósitos bacterianos e consequente diminuição dos sinais clínicos da inflamação. Essa é uma limitação do presente estudo que pode ter influenciado na detecção dos níveis de MMP9 observados.

Nas análises de correlação dos miRNAs com seus possíveis alvos, o miRNA-29b apresentou apenas uma correlação negativa com a MMP-2 na PC. Tal correlação também foi observada ao considerarmos o miRNA142-3p. Evidências da regulação negativa da MMP-2 pelos referidos miRNAs têm sido relatadas em algumas doenças (WANG *et al.* 2015; Chen, 2011; ZHENG Z ,2014; QIN, 2017). Essas correlações foram observadas apenas no grupo doente, sugerindo ser um mecanismo específico da patogênese da periodontite. A presença do estímulo bacteriano induzido por moléculas de LPS de *P. gingivalis* podem influenciar a expressão do miRNA nos tecidos gengivais inflamados (OLSEN, SINGHRAO & OSMUDSEN, 2017; MOLTENI, BOSI & ROSSETTI *et al.* 2018). O miRNA 29b modula a resposta específica dos macrófagos após a exposição ao LPS (NAQVI *et al.*, 2014), podendo assim influenciar a produção de MMP-2 pelos macrófagos (SORSA *et al.*, 2006). Embora os resultados obtidos sugerem um papel dos miRNAs 29b e 142-3p como reguladores negativos da transcrição da MMP-2 nos tecidos gengivais de indivíduos com PC, esse dado se contrapõe à maior transcrição de MMP-2 verificada em PC. As MMPs são secretadas como precursores latentes (proMMPs) e requerem ativação. A expressão e a atividade são reguladas em múltiplos níveis de transcrição, secreção, ativação de pró-MMPs, e interação com inibidores de MMPs (SORSA *et al.*, 2006). É importante também ressaltar que outros mecanismos regulatórios podem estar atuando e

contribuindo para o aumento da transcrição da MMP-2 na PC. Pode-se citar como exemplos a presença de outros miRNAs (GUO *et al.*, 2018), polimorfismos genéticos (LUCZYSZYN *et al.* 2012; AJMERA *et al.* 2016), e hipometilação do DNA (CHOI *et al.* 2013), dentre outros.

Em relação ao miRNA 142-3p, correlações positivas com ambas as MMPs e também com a DNMT3B foram observadas no grupo C, e com a DNMT1 no grupo PC. Além disso, no presente estudo foi evidente a presença de perfis diferentes de correlações dos miRNAs com os alvos avaliados considerando cada grupo, C e PC. Esses resultados podem refletir a complexa regulação gênica realizada pelos miRNAs. Até recentemente acreditava-se que os miRNAs atuavam na modulação da expressão gênica exclusivamente como regulador negativo do RNAm alvo (BARTEL, 2004). No entanto, dados crescentes indicam que os miRNAs podem oscilar entre repressão e estimulação da expressão gênica em resposta às condições celulares específicas, sequências e cofatores. A regulação positiva da expressão gênica pelos miRNAs pode ocorrer direta ou indiretamente, de forma seletiva e específica (VASUDEVAN, TONG & STEITZ, 2007; ORANG, SAFARALIZADEH & KAZEMZADEH, 2014). Assim como a indução da transcrição dos miRNAs pode apresentar a participação de outros fatores. Como visto por Li *et al.* (2017), a expressão do miRNA-142-3p foi induzida em células epiteliais gengivais por TNF- α de maneira dependente de tempo e concentração na PC.

Não foram observadas correlações estatisticamente significativas considerando as variáveis DNMTs, MMPs e os miRNAs com os parâmetros de profundidade de sondagem e perda de inserção clínica. Tal fato sugere que essas variáveis não estão relacionadas com a gravidade da periodontite. No entanto vale ressaltar a questão sobre os indivíduos do grupo PC terem sido submetidos ao tratamento inicial de raspagem e alisamento radicular, o que de certa forma pode ter minimizado a inflamação e não ser condizente com os índices de destruição periodontal da região avaliada. Estudos longitudinais são necessários para esclarecer a participação dos miRNAs na progressão e gravidade da doença.

Embora os estudos sobre miRNAs na doença periodontal sejam incipientes, não tem sido observado um consenso entre os resultados descritos na literatura. Razões podem ser devido aos diferentes critérios de seleção dos grupos amostrais, tipo de

amostra, metodologia aplicada (XIE *et al.*, 2011 ; STOECKLIN *et al.*, 2012). No entanto, todos os trabalhos ressaltam a provável participação dos miRNAs no desenvolvimento da doença periodontal, como também visto no presente trabalho. Nossos dados sugerem uma associação dos miRNA 29b e 142-3p com a PC e um perfil de atuação diferenciado dos miRNAs sobre seus alvos nos tecidos gengivais na presença ou ausência da doença. Estudos adicionais são necessários para esclarecer a forma como esses miRNAs atuam, como regulam seus alvos e como os próprios miRNAs são regulados.

Até o presente momento não há outros trabalhos na literatura que avaliaram os miRNAs 29b e 142-3p e suas correlações com as MMPs e DNMTs nos tecidos gengivais. Novos estudos mostram-se necessários para elucidar o real papel desempenhado por esses reguladores gênicos nos tecidos gengivais e/ou tipos celulares específicos. Esses estudos poderão ser úteis para o surgimento de propostas diagnósticas e terapêuticas alternativas para a periodontite através de tecnologias moleculares que controlem os eventos epigenéticos de atuação dos miRNAs.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho sugere que os miRNAs 142-3p e 29b estão relacionados à PC como um dos possíveis reguladores epigenéticos da doença. Embora os resultados obtidos sugiram a DNMT1 e a MMP-2 como alvos dos miRNAs avaliados nos tecidos gengivais inflamados, estudos adicionais são necessários para elucidar os reais mecanismos de atuação desses miRNAs. O presente trabalho gera inúmeras perspectivas de estudos necessários para determinar a relevância funcional desses mecanismos na patogênese da periodontite e para o possível surgimento de propostas diagnósticas e terapêuticas alternativas para a PC.

REFERÊNCIAS

AAP (The American Academy of Periodontology). International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. **Ann Periodontol**, v.4, n.1,1999.

AAP (The American Academy of Periodontology). World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Ann Periodontol**, v.89, n.1, .2018.

ADCOCK IA, TSAPROUNI L, BHAVSAR P, ITO K. Epigenetic regulation of airway inflammation. **Curr Opin Immunol** v. 19, n.6, p. 694-700, 2007.

AGE, R.C. Advances in the pathogenesis of periodontitis; summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontol 2000**, v.14, n.1,p. 216-248, jun. 1997.

AJMERA DH, SINGH P, ZHU Y, LI W, SONG J. A meta-analysis of MMP-9 promoter -1562 C/T polymorphism on susceptibility of chronic periodontitis. **Springerplus**. v.26,n.5,p.526,2016.

ALEXANDER, M. & O'CONNELL, R. M. Noncoding RNAs and chronic inflammation: micro-managing the fire within. **BioEssays** v.37, p.1005–1015 2015.

AMORMINO SAF, ARÃO TC, SARAIVA AM, GOMEZ RS, DUTRA WO, COSTA JE, SILVA JFC, MOREIRA PR. Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. **Human Immunology**. V. 74,n.9, p. 1231-1236, 2013

ARÃO , T. Avaliação de microRNAs na Periodontite Crônica. Julho 2015. 111 f.Tese(Doutorado em Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2015.

ARMITAGE G.C. Development of a classification system for periodontal disease and conditional. **Ann Periodontol**, v.4, n.1, p.1-16, 1999.

BAEZA M, GARRIDO M, HERNANDEZ-RAMOS P, DEZEREGA A, GARCIA-SESNICH J, STRAUSS F, AITKEN JP, LESAFFRE E, VANBELLE S, GAMONAL J, BRIGNARDELLO-PETERSEN R, TERVAHARTIALA T, SORSA T, HERNANDEZ M. Diagnostic accuracy for apical and chronic periodontitis biomarkers in gingival crevicular fluid: an exploratory study. **J Clin Periodontol**. v. 43,p. 34–45,2016.

BANERJEE S, BACANAMWO M. DNA methyltransferase inhibition induces mouse embryonic stem cell differentiation into endothelial cells. **Exp Cell Res**. 15; v. 316,n.2, p.172-180,2010.

BAYARSAIHAN DJ. Epigenetic mechanisms in inflammation. **Dent Res.** v.90, n.1. p.9-17,2011.

BAYLIN SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol**, v.2, n.1, p.4-11, 2005.

BENAYOUN BA, POLLINA EA, BRUNET A. Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. **Nat Rev Mol Cell Biol**; v.16,n.10,p.593-610, 2015.

BILDT, M. M., BLOEMEN, M., KUIJPERS-JAGTMAN, A. M., & VON DEN HOFF, J. W. Collagenolytic fragments and active gelatinase complexes in periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 79,n.9, p.1704–1711,2008.

BIRKEDAL-HANSEN H, MOORE WG, BODDEN MK, WINDSOR LJ, BIRKEDALHANSEN B, DECARLO A, ENGLER JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* v.4,p.197-250,1993.

BRACONI C, HUANG N, PATEL T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. **Hepatology** ; v. 51, n.3,p. 881-890,2010.

CATON, JACK G, ARMITAGE, GARY, BERGLUNDH, TORD, IAIN L.C. CHAPPLE, SOREN JEPSEN, KENNETH S. KORNMAN, BRIAN L. MEALEY, PANOS N. PAPAPANOU, MARIANO SANZ MAURIZIO S. TONETTI. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. **J Clin Periodontol.**v.45, n.:45(Suppl 20) p.S1–S8, 2018.

CHEN KC, WANG YS, HU CY, CHANG WC, LIAO YC, DAI CY, JUO SH. OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases. **FASEB J.** v.25, p.1718–1728,2011.

CHOI I-S, YU K, KIM J, et al. Alterations in the DNA Methylation Patterns of Calca, Timp3, Mmp2 and Igf2r are Associated with Chronic Cystitis in a Cyclophosphamide-Induced Mouse **Model. Urology.** v.82,p.253–259, 2013.

COUSSENS, L. M., FINGLETON, B., & MATRISIAN, L. M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. **Science**, 295(5564), p.2387–2392.,2002.

DAI F, ZHANG Y, ZHU X, The anti-chemoresistant effect and mechanism of MUC1 aptamer-miR-29b chimera in ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v. 131, p.451-459,2013.

DE FARIA AMORMINO SA, ARAO TC, SARAIVA AM, GOMEZ RS, DUTRA WO, DA COSTA JE et al. Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. **Hum Immunol**; v.74, p.1231-1236, 2013.

DE OLIVEIRA NF, ANDIA DC, PLANELLO AC, PASETTO S, MARQUES MR, NOCITI FH JR et al. TLR2 and TLR4 gene promoter methylation status during chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**; v.38, n.11,p.975-983, 2011.

DE SOUZA AP, PLANELLO AC, MARQUES MR, DE CARVALHO DD, LINE SR. High-throughput DNA analysis shows the importance of methylation in the control of immune inflammatory gene transcription in chronic periodontitis. **Clin Epigenetics**. v.6, p.15, 2014.

DEVASKAR SU, THAMOTHARAN M. Metabolic programming in the pathogenesis of insulin resistance. **Rev Endocr Metab Disord**. v.8, p.105-113, 2007.

DING Y, UITTO VJ, HAAPASALO M, LOUNATMAA K, KONTTINEN YT, SALO T, GRENIER D, SORSA T. Membrane components of *Treponema denticola* trigger proteinase release from human polymorphonuclear leukocytes. **J Dent Res**, v.75, p.1986–1993.1996.

EDWARDS TM, MYERS JP. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. **Environ Health Perspect**; n.115,p.1264-1270,2007.

EULALIO A, SCHULTE L, VOGEL J. The mammalian microRNA response to bacterial infections. **RNA Biol**. v.9, p.742–750,2012,

FABBRI M, CALIN GA. Epigenetics and miRNAs in human cancer. **Adv Genet** v. 70, p. 87-99, 2010.

FABBRI M, GARZON R, CIMMINO A, LIU Z, ZANESI N, CALLEGARI E. et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. **Proc Natl Acad Sci** v.104, n. 40 , p.15805-15810, 2007.

FEINBERG AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. **Nature** v. 447p.433-440, 2007.

FITZPATRICK, D.R.; WILSON, C.B. Methylation and demethylation in regulation of genes, cells, and responses in the immune system. **Clin Immunol**, v.109, n.1, p. 37-45, oct. 2003.

FORDHAM, J. B., NAQVI, A. R. & NARES, S. Regulation of miR-24, miR-30b, and miR-142-3p during macrophage and dendritic cell differentiation potentiates innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* v.98, p.195–207,2015.

FRIEDMAN R.C., FARH K.K., BURGE C.B., BARTEL D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res.** v.19 p. 92–105,2009.

GONCALVES LDR, OLIVEIRA G, HURTADO PA, FEITOSA A, TAKIYA CM, GRANJEIRO JM, TRACKMAN PC, OTAZU' I, FERES-FILHO EJ. Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflamed gingival biopsies. **J Periodont Res;** v.43, p. 570–577,2008.

GOPISETTY, G.; RAMACHANDRAN, K.; SINGAL, R. DNA methylation and apoptosis. **Mol Immunol,** v.43, n. 11, p.1729-1740, feb. 2006.

GUO J, ZENG X, MIAO J, LIU C, WEI F, LIU D, ZHENG Z, TING K WANG C, LIU Y. MiRNA-218 regulates osteoclast differentiation and inflammation response in periodontitis rats through Mmp9. **Cell Microbiol.** v. 16,p.12979,2018.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol 2000,** v. 5, n.1, p. 78-111, jun. 1994.

HERNÁNDEZ, M., GAMONAL, J., TERVAHARTIALA, T., MANTYLA, P., RIVERA, O., DEZEREGA, A., DUTZAN, N. & SORSA, T. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. **Journal of Periodontology** v. 81, 1644–1652,2010.

HERRERA BM, KEILDSON S, LINDGREN CM. Genetics and epigenetics of obesity. **Maturitas.**v.69,p.41-49,2011.

INGMAN, T., SORSA, T., LINDY, O., KOSKI, H., & KONTTINEN, Y. T. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. **Journal of Clinical Periodontology,** v.21, n.1, p.26–31,1994.

ISHIKAWA, I. Host responses in periodontal disease: a preview. **Periodontol 2000,** v. 43, p. 9-13, 2007.

JOHNSON IT, BELSHAW NJ: Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. **Food Chem Toxicol** v.46, n. 4, p. 1346-1359, 2008.

KANAAN, Z., REBECCA BARNETT, SARAH GARDNER, BOBBY KESKEY , DEVIN DRUEN2, ADRIAN BILLETER, WILLIAM G CHEADLE. Differential microRNA expression could explain microbial tolerance in a novel chronic peritonitis model **Innate Immunity**, v.19, n.2, p. 203–212, 2012.

LEE Y, KIM M, HAN J, YEOM KH, LEE S, BAEK SH, KIM VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J** ;v. 23:4051–4060,2004.

LEE YH, NA HS, JEONG SY, JEONG SH, PARK HR, CHUNG J. Comparison of inflammatory microRNA expression in healthy and periodontitis tissues. **Biocell**; 35: 43-49,2011.

LEPPILAHTI JM, HERNÁNDEZ-RÍOS PA, GAMONAL JA, TERVAHARTIALA T, BRIGNARDELLO-PETERSEN R, MANTYLA P, SORSA T, HERNÁNDEZ M. Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in GCF provide site-specific diagnostic value for chronic periodontitis, **Journal of Clinical Periodontology**, v. 41, n. 4, p. 348–356, 2014.

LI S, SONG Z, DONG J, SHU R. microRNA-142 is upregulated by tumor necrosis factor-alpha and triggers apoptosis in human gingival epithelial cells by repressing BACH2 expression. **American journal of translational research**. v. 9,p.175–183,2017.

LIN, S., AND GREGORY, R.I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nature reviews Cancer**. v.15, 321-333, 2015.

LINDHE J, SOCRANSKY SS, NYMAN S, HAFFAJEE A, WESTFELT E Progression of periodontal disease in adult subjects in the absence of periodontal therapy. **J Clin Periodontol**. v.10,n.4,433-442,1983.

LINDHE, J.; OKAMOTO, H.; YONEYAMA, T.; HAFFAJEE, A.; SOCRANSKY S.S. Longitudinal changes in periodontal disease in untreated subjects. **J Clin Periodontol**,v.16,n.10, p.662-670,1989.

LIU, N., CAO, Y., & ZHU, G. Expression of matrix metalloproteinases-2, -9 and reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in gingiva in periodontal health and disease **Archives of Oral Biology** p. 62–67, 2017

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Methods**,v.25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOPEZ, NJ; SMITH, PC; GUTIERREZ, J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: A randomized controlled trial. **Journal Periodontology** v. 73,p.911-924, 2002.

LUAN X, ZHOU X, NAQVI A, FRANCIS M, FOYLE D, NARES S, DIEKWISCH TGH MicroRNAs and immunity in periodontal health and disease. **Int J Oral Sci.** v.10 n.3 p. 24,2018.

LUCZYSZYN SM1, DE SOUZA CM, BRAOSI AP, DIRSCHNABEL AJ, CLAUDINO M, REPEKE CE, FAUCZ FR, GARLET GP, PECOITS-FILHO R, TREVILATTO PC. Analysis of the association of an MMP1 promoter polymorphism and transcript levels with chronic periodontitis and end-stage renal disease in a Brazilian population. **Arch Oral Biol.** v.57,n.7,p.954-963,2012.

MAEGDEFESSEL, L. The emerging role of microRNAs in cardiovascular disease. **J. Intern. Med.** v. 276, p.633–644 ,2014.

MAKELA M, SALO T, UITTO VJ, LARJAVA H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. **J Dent Res.** v.73,p.1397–1406,1994.

MARTINS, P.H.F. Mecanismos patogênicos na doença periodontal: aspectos imunológicos. Belo Horizonte: **Faculdade de Odontologia da UFMG**, 1997.

MIAO D, GODOVIKOVA V, QIAN X, SESHADRINATHAN S, KAPILA YL, FENNO JC. Treponema denticola upregulates MMP-2 activation in periodontal ligament cells: interplay between epigenetics and periodontal infection. **Arch Oral Biol.** v. 59,n.10,p.1056-1064, 2014.

MOLTENI M, BOSI A, ROSSETTI C. The Effect of Cyanobacterial LPS Antagonist (CyP) on Cytokines and Micro-RNA Expression Induced by Porphyromonas gingivalis LPS. **Toxins Basel.** v.10,n.7,2018.

MOORE WEC; MOORE LVH. The bacteria of periodontal disease. **Periodontology 2000**, 5: 66-77, 1994.

MOREIRA, NM Avaliação do microRNA 148a e da DNMTs na Periodontite Crônica, Abril 2017, 19 f. Monografia (graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais , 2017.

NAQVI, A. R., FORDHAM, J. B., GANESH, B. & NARES, S. miR-24, miR-30b and miR-142- 3p interfere with antigen processing and presentation by primary macrophages and dendritic cells. **Sci. Rep.** v.6, 325-329, 2016.

NAQVI, A. R., FORDHAM, J. B., KHAN, A. & NARES, S. MicroRNAs responsive to Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis LPS modulate expression of genes regulating innate immunity in human macrophages. **Innate Immun.** v.20, p.540–551,2014.

OLSEN I., SINGHRAO S.K., OSMUDSEN H. Periodontitis, pathogenesis and progression: miRNA-mediated cellular responses to *Porphyromonas gingivalis*. **J. Oral. Microbiol.** v.9, n.1, 2017

PAGE, R.C.; SCHROEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Laboratory Investigation**, v.34, n.3, p. 235-249, mar. 1976.

PAULEY, K. M., CHA, S. & CHAN, E. K. L. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. **J. Autoimmun.** v.32, p.189–194 ,2009.

PEREIRA G, GUIMARÃES GN, PLANELLO AC, SANTAMARIA MP, DE SOUZA AP, LINE SR, MARQUES MR. *Porphyromonas gingivalis* LPS stimulation downregulates DNMT1, DNMT3a and JMJD3 gene expression levels in human HaCaT Keratinocytes. **Clin Oral Invest.** v. 17,p. 1279-85 2013.

PERRI, R., NARES, S., ZHANG, S., BARROS, S. P. & OFFENBACHER, S. MicroRNA modulation in obesity and periodontitis. **J. Dent. Res.** v.91, p.33–38 ,2011.

QIN W, RONG X, DONG J, YU C, YANG J. miR-142 inhibits the migration and invasion of glioma by targeting Rac1. **Oncol Rep.** v. 38, n. 3, p.1543-1550,2017.

REYNOLDS, J. J., & MEIKLE, M. C.. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. **Periodontology**, v. 14, p.144–157. 2000.

RICHARDSON, B. DNA methylation and auto immune disease. **Clinical Immunology.** v.109, n.1, p.72-79, 2003.

RU P, STEELE R, NEWHALL P. miRNA-29b suppresses prostate cancer metastasis by regulating epithelialmesenchymal transition signaling. **Mol Cancer Ther**, v.11, p. 1166-1173,2012.

RYAN, M. E., RAMAMURTHY, S. & GOLUB, L. M. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. **Current Opinion in Periodontology** v;3, p.85–96,1996.

SAYED, D; ABDELLATIF M. MicroRNAs in development and disease **Physiological Reviews** v.91, p.827–887, 2011.

SCHMALZ, G. et al. MicroRNAs as salivary markers for periodontal diseases: a new diagnostic approach? **Biomed. Res. Int** v. 2016, p. 1-14, 2016.

SHARMA S, JING LIU, JIANQIN WEI, HUIJUN YUAN, TAIFANG ZHANG, NANETTE H BISHOPRIC. Repression of miR-142 by p300 and MAPK is required for survival signalling via gp130 during adaptive hypertrophy. **EMBO Molecular Medicine**. v.4,p.617–632,2012.

SMITH IM, MYDLARZ WK, MITHANI SK, CALIFANO JA. DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. *Int J Cancer*; v.121, n.8,p.1724-1728,2007.

SODEK, J. & OVERALL, C. M. Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. **Matrix 1 (Suppl.)** p. 352–362,1992.

SONTHEIMER, E.J. Assembly and Function of RNA Silencing Complexes. **Nature Reviews Molecular Cellular Biology**. v.6, 127–138,2005.

SORSA, T., TJADERHANE, L., KONTTINEN, Y. T., LAUHIO, A., SALO, T., LEE, H. M., et al.. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. **Annals of Medicine**, v. 38, n.5, 306–321,2006.

STOECKLIN-WASMER, C; GUARNIERI, P; CELENTI, R; DEMMER, RT; KEBSCHULL, M; PAPAPANOU, PN. MicroRNAs and their 74 target genes in gingival tissues. **Journal of Dental Research** v. 91, n.10, p. 934-940, 2012.

SULEWSKA A, NIKLINSKA W, KOZLOWSKI M, MINAROWSKI L, NAUMNIK W, NIKLINSKI J, DABROWSKA K, CHYCZEWSKI L. DNA methylation in states of cell physiology and pathology. **Folia Histochem Cytobiol**. v.45,n.3,p.149-158,2007.

SUN, Y; VARAMBALLY, S; MAHER, CA; CAO, Q; CHOCKLEY, P; TOUBAI, T; MALTER, C; NIEVES, E; TAWARA, I; WANG, Y; WARD, PA; CHINNAIYAN, A; REDDY, P. Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality. **Blood** 9; v.117n.23, p. 6172-6183 2011.

VALINLUCK V, SOWERS LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. **Cancer Res**. v.67, n.3, p. 946-950, 2007.

VAN DER ZEE E, EVERTS V, BEERTSEN W. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. **J Clin Periodontol** v.24, p.297–305,1997.

VARKONYI-GASIC E, WU R, WOOD M, WALTON EF, HELLENS RP. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. **Plant Methods**, v.12, p.3-12, 2007.

VASILATO, DIAMANTINA, PAPAGEORGIOU, SOTIRIOS G et al. Epigenetic alterations and microRNAs - New players in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **Epigenetics**, v. 8, n. 6, p. 561–570, 2013.

VASUDEVAN, S., TONG Y., STEITZ, J. A Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1931–1934, 2007

VISSE R, NAGASE H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**.v. 92, p. 827–839,2003.

WANG H, GUAN X, TU Y, ZHENG S, LONG J, LI S, QI C, XIE X, ZHANG H, ZHANG Y. MicroRNA-29b attenuates non-small cell lung cancer metastasis by targeting matrix metalloproteinase 2 and PTEN. **J Exp Clin Cancer Res**. v.34,n. 59, 2015.

WILLEMS, E., L. LEYNS, AND J. VANDESOMPELE. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. **Anal. Biochem**. v.379,p.127–129, 2008.

WOESSNER J. F., JR., NAGASE H. Matrix metalloproteinases and TIMPs (Protein Profile Series) (Sheterline P., editor. , ed) **Oxford University Press**, 2000.

XIAO P, LIU WL. MiR-142-3p functions as a potential tumor suppressor directly targeting HMGB1 in non-small-cell lung carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**. v.8,p.10800–10807,2015.

XIAO Y1, WORD B, STARLARD-DAVENPORT A, HAEFELE A, LYN-COOK BD, HAMMONS G. Age and gender affect DNMT3a and DNMT3b expression in human liver. **Cell Biol Toxicol**. v. 24,n.3,p.265-272,2008.

XIE YF, SHU R, JIANG SY, LIU DL, ZHANG XL. Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues. **Int J Oral Sci** v. 3, p. 125-134,2011.

XITING LI, JIAXUAN LU, WEI TENG, CHUANJIANG ZHAO, XIAOLEI YE Quantitative Evaluation of MMP-9 and TIMP-1 Promoter Methylation in Chronic Periodontitis **DNA and Cell Biology** v. 37, n. 3, 2018.

YANG, Y., ZHU JIN, RUI DONG, CHAO ZHENG , YANLEI HUANG , YIJIE ZHENG , ZHEN SHEN , GONG CHE, XIAOYING LUO AND SHAN ZHENG. MicroRNA-29b/142-5p contribute to the pathogenesis of biliary atresia by regulating the IFN- γ gene. **Cell Death and Disease** v.9, p.545,2018.

YIN L, CHUNG WO Epigenetic regulation of human β -defensin 2 and CC chemokine ligand 20 expression in gingival epithelial cells in response to oral bacteria. **Mucosal Immunol** v.4, p.409–419,2011.

ZHANG S, BARROS SP, MORETTI AJ, YU N, ZHOU J, PREISSER JS et al. Epigenetic regulation of TNFA expression in periodontal disease. **J Periodontol.** V. 84, n. 11, p.1606-1616, 2013.

ZHENG Z, DING M, NI J, SONG D, HUANG J, WANG J. MiR-142 acts as a tumor suppressor in osteosarcoma cell lines by targeting Rac1 **Oncol Rep.**v. 33, n. 3, p. 1291-1299, 2015.

APÊNDICE

Apêndice A FICHA CLÍNICA

Dados Pessoais do Paciente

Nome: _____ Sexo: _____ Est. Civil: _____
Data de Nascimento: ____/____/____ Naturalidade: _____
Nacionalidade: _____
Profissão: _____ RG: _____ CPF: _____
Renda Familiar: () 1-2 salários () 3-5 salários () 6-10 salários
Endereço: _____ Tel: _____
Bairro: _____ UF: _____ CEP: _____
Cidade: _____

ANAMNESE

1. Queixa principal: _____
2. Início e evolução da doença, quando foi último tratamento: _____
3. Está sob tratamento médico? _____
4. Faz uso de algum medicamento? _____
5. Fez uso de antibiótico e/ou antiinflamatórios nos últimos 6 meses? _____
6. Tem algum tipo de alergia? _____
7. Apresenta as seguintes condições:
() Alteração de pressão arterial () Diabetes
() Alteração cardíaca () Doenças endócrinas
() Hemorragias ou doenças hematológicas () AIDS
() História de febre reumática () Osteoporose
() Doença /alteração respiratória () Uso de aparelho ortodôntico
() Doença /alteração gastro-intestinal () Gravidez
() Doenças renais () Outros: _____
8. Existe, na família alguma das alterações sistêmicas citadas? _____
Qual o grau de parentesco? _____
9. Hábitos
1. Fumante: () Fumou por quanto tempo: _____
Quantidade: _____ Tipo: _____
2. Ex-fumante: () Abandonou o hábito há quanto tempo? _____
3. Não Fumante ()
4. Quantas vezes ao dia escova os dentes? _____
Sim Não
5. Usa fio dental? () ()
6. Apresenta sangramento durante a escovação? () ()
7. Apresenta mobilidade nos dentes? () ()
8. Já perdeu algum dente devido à mobilidade? () ()
Observações: _____

Apêndice B Ficha Periodontal (Periodontograma)

Nome: _____
 _____ Código: _____
 Tel: _____ Profissão: _____
 Gênero _____
 Data do exame: ____/____/____ Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____

| Dente | Profundidade de Sondagem | | | | Nível de inserção | | | | Sangramento à sondagem | | | | Furca (1, 2, 3) | Mobilidade (0, 1, 2, 3) | Prognóstico | Dente |
|-------|--------------------------|---|---|---|-------------------|---|---|---|------------------------|---|---|---|--------------------|----------------------------|-------------|-------|
| | D | V | M | L | D | V | M | L | D | V | M | L | | | | |
| 18 | | | | | | | | | | | | | | | | 18 |
| 17 | | | | | | | | | | | | | | | | 17 |
| 16 | | | | | | | | | | | | | | | | 16 |
| 15 | | | | | | | | | | | | | | | | 15 |
| 14 | | | | | | | | | | | | | | | | 14 |
| 13 | | | | | | | | | | | | | | | | 13 |
| 12 | | | | | | | | | | | | | | | | 12 |
| 11 | | | | | | | | | | | | | | | | 11 |
| 21 | | | | | | | | | | | | | | | | 21 |
| 22 | | | | | | | | | | | | | | | | 22 |
| 23 | | | | | | | | | | | | | | | | 23 |
| 24 | | | | | | | | | | | | | | | | 24 |
| 25 | | | | | | | | | | | | | | | | 25 |
| 26 | | | | | | | | | | | | | | | | 26 |
| 27 | | | | | | | | | | | | | | | | 27 |
| 28 | | | | | | | | | | | | | | | | 28 |
| 38 | | | | | | | | | | | | | | | | 38 |
| 37 | | | | | | | | | | | | | | | | 37 |
| 36 | | | | | | | | | | | | | | | | 36 |
| 35 | | | | | | | | | | | | | | | | 35 |
| 34 | | | | | | | | | | | | | | | | 34 |
| 33 | | | | | | | | | | | | | | | | 33 |
| 32 | | | | | | | | | | | | | | | | 32 |
| 31 | | | | | | | | | | | | | | | | 31 |
| 41 | | | | | | | | | | | | | | | | 41 |
| 42 | | | | | | | | | | | | | | | | 42 |
| 43 | | | | | | | | | | | | | | | | 43 |
| 44 | | | | | | | | | | | | | | | | 44 |
| 45 | | | | | | | | | | | | | | | | 45 |
| 46 | | | | | | | | | | | | | | | | 46 |
| 47 | | | | | | | | | | | | | | | | 47 |
| 48 | | | | | | | | | | | | | | | | 48 |

ANEXOS

Anexo A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Paciente grupo caso)

Esse documento tem como finalidade propor sua participação no projeto de pesquisa que tem o seguinte título: "Avaliação de Alterações Epigenéticas na Periodontite Crônica". A Periodontite é uma doença que afeta as gengivas e o osso que sustentam os dentes, principalmente em adultos, sendo a principal causa de perda dos dentes. Acreditamos que determinados hábitos e estilos de vida alterem o material genético (alterações epigenéticas) que cada indivíduo possui e isso seja o principal motivo que explique o porquê algumas pessoas são mais afetadas que outras pela Periodontite. Precisamos estudar mais sobre essa doença para que possamos entender melhor sua causa e assim melhorar o tratamento dos pacientes.

O objetivo deste estudo é identificar se essas alterações do material genético poderiam causar ou agravar a doença.

Para realização deste estudo será necessário coletar uma parte deste tecido removido durante a cirurgia periodontal, além de coletar sangue, saliva, raspado de mucosa bucal e fluido gengival.

A coleta de raspado será feita com uma escovinha macia e esterilizada que será esfregada na região de bochechas. A coleta de fluido gengival será feita por uma pequena ponta de papel também esterilizada que será colocada próxima a sua gengiva. A coleta da saliva será realizada em tubos apropriados e descartáveis, sendo necessário que você mastigue um rolinho de algodão previamente esterilizado. E para a coleta de sangue será realizada uma punção venosa, utilizando materiais totalmente descartáveis e apropriados. Esta coleta de sangue será realizada na própria Faculdade de Odontologia UFMG em uma sala de coletas, sendo realizada por uma técnica em Enfermagem devidamente treinada, juntamente com a Pesquisadora responsável pelo estudo. Todos os procedimentos serão realizados por pessoas devidamente capacitadas, o que não impede a possibilidade da ocorrência de hematomas (áreas arroxeadas) após a coleta da amostra de sangue. Este estudo não terá custos para você. E você poderá retirar o consentimento a qualquer momento da pesquisa, havendo continuidade normal do seu tratamento. O seu tratamento será realizado normalmente mesmo que haja recusa em assinar esse termo.

Esta pesquisa poderá contribuir para um melhor entendimento sobre como se desenvolve a doença Periodontite, podendo melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a utilização de parte do tecido que foi removida através cirurgia, além da saliva, sangue, raspado de mucosa e fluido gengival coletados para este projeto de pesquisa. Permito também, a utilização de todos dados obtidos e fotos para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: _____

Data: ___/___/_____

Nome do paciente
DOCUMENTADO APRESENTADO: _____

Assinatura do paciente
N.º: _____

Pesquisadores: **Telma Cristina Arão, Nayágara Moreira** Telefone: (31) 34093004

Assinatura Pesquisador: _____

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Paula Rocha Moreira** Telefone: (31) 34093004 **COEP**
(Comissão de Ética em Pesquisa) Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II – 2º andar
– Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG, Brasil. 31270-901. coop@prpq.ufmg.br
telefax 31 3409-459

Anexo B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Paciente controle)

Esse documento tem como finalidade propor sua participação no projeto de pesquisa que tem o seguinte título: "Avaliação de Alterações Epigenéticas na Periodontite Crônica". A Periodontite é uma doença que afeta as gengivas e o osso que sustentam os dentes, principalmente em adultos, sendo a principal causa de perda dos dentes. Acreditamos que determinados hábitos e estilos de vida alterem o material genético (alterações epigenéticas) que cada indivíduo possui e isso seja o principal motivo que explique o porquê algumas pessoas são mais afetadas que outras pela Periodontite. Precisamos estudar mais sobre essa doença para que possamos entender melhor sua causa e assim melhorar o tratamento dos pacientes.

O objetivo deste estudo é identificar se essas alterações do material genético poderiam causar ou agravar a doença.

Para realização deste estudo será necessário coletar uma parte deste tecido removido durante a cirurgia odontológica, além da coleta de sangue, saliva, raspado de mucosa bucal e fluido gengival.

A coleta de raspado será feita com uma escovinha macia e esterilizada que será esfregada na região de bochechas. A coleta de fluido gengival será feita por uma pequena ponta de papel também esterilizada que será colocada próxima a sua gengiva. A coleta da saliva será realizada em tubos apropriados e descartáveis, sendo necessário que você mastigue um rolinho de algodão previamente esterilizado. E para a coleta de sangue será realizada uma punção venosa, utilizando materiais totalmente descartáveis e apropriados. Esta coleta de sangue será realizada na própria Faculdade de Odontologia UFMG em uma sala de coletas, sendo realizada por uma técnica em Enfermagem devidamente treinada, juntamente com a Pesquisadora responsável pelo estudo. Todos os procedimentos serão realizados por pessoas devidamente capacitadas, o que não impede a possibilidade da ocorrência de hematomas (áreas arroxeadas) após a coleta da amostra de sangue. Este estudo não terá custos para você. E você poderá retirar o consentimento a qualquer momento da pesquisa, havendo continuidade normal do seu tratamento. O seu tratamento será realizado normalmente mesmo que haja recusa em assinar esse termo.

Esta pesquisa poderá contribuir para um melhor entendimento sobre como se desenvolve a Periodontite Crônica, podendo melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a utilização de parte do tecido que foi removida através cirurgia, além da saliva, sangue, raspado de mucosa e fluido gengival coletados para este projeto de pesquisa. Permito também, a utilização de todos dados obtidos e fotos para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: _____

Data: __/__/_____

Nome do paciente
DOCUMENTADO APRESENTADO: _____

Assinatura do paciente
N.º: _____

Pesquisadora: **Telma Cristina Arão, Nayágara Moreira**

Telefone: (31) 34093004

Assinatura Pesquisador: _____

Orientadora: **Profª. Drª. Paula Rocha Moreira**

Telefone: (31) 34093004

COEP (Comissão de Ética em Pesquisa) Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II – 2º andar – Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG, Brasil. 31270-901. coep@prpq.ufmg.br telefax 31 3409-4592