

TELMA CRISTINA ARÃO

Avaliação de microRNAs na Periodontite Crônica

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Julho 2015

TELMA CRISTINA ARÃO

Avaliação de microRNAs na Periodontite Crônica

Tese 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 à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Rocha Moreira

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Julho 2015

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos os pacientes portadores de Doenças Periodontais, em especial, a todos aqueles que gentilmente aceitaram participar desse estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder a vida e, conseqüentemente, a oportunidade de aprimoramento;

À minha família, especialmente aos meus pais, Dalmo e Nízia, por toda dedicação. E às minhas irmãs, Denise, Débora e Tatiane, pela amizade;

Ao Arthur pelos momentos de compreensão nos momentos difíceis;

À minha orientadora, Professora Paula Rocha Moreira, pela confiança e oportunidade;

Aos alunos de iniciação científica Nayágara, Luiz Paulo e Alysso pelo auxílio;

Aos professores e colegas do Laboratório de Biologia das Interações Celulares (ICB-UFMG) pela parceria, troca de experiências, solidariedade e pelos bons momentos juntos;

À Professora Érika Jorge e aos alunos do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento (ICB-UFMG), em especial, à aluna Aline Copola;

Aos professores Luiz Macedo, Paula Magalhães e aos alunos do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (ICB-UFMG), em especial, à aluna Amanda Borges;

Ao Zoloft pelo apoio;

Aos funcionários (ICB-UFMG), em especial, Jamil Silvano e Kayla Veruska;

À Faculdade de Odontologia (UFMG), em especial, professora Tarcília Silva;

Ao IPSEMG;

Aos amigos e pacientes da prefeitura Municipal de Ribeirão das Neves;

Às agências financiadoras CNPq, CAPES e FAPEMIG;

Aos pacientes voluntários desse estudo;

E a todos aqueles que participaram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

EPÍGRAFES

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

Tudo tem seu apogeu e seu declínio...

É natural que seja assim, todavia, quando tudo parece convergir para o que supomos o nada, eis que a vida ressurge, triunfante e bela!...

Novas folhas, novas flores, na infinita benção do recomeço!

Chico Xavier

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Anatomia do Periodonto

Figura 2. Modelo esquemático do papel da molécula MafB na regulação da osteoclastogênese

Figura 3. Biogênese dos miRNAs

Figura 4. Possíveis mecanismos de regulação gênica pós transcricional desempenhado pelos miRNAs

Figura 5. Fluxograma dos experimentos realizados

Figura 6. Modelo placa PCR *Array*

Figura 7. Representação esquemática do *stem-looped* RT *primer* TaqMan® para identificação de miRNAs

Figura 8. Representação esquemática da técnica de hibridização *in situ* (HIS)

Figura 9. Controle negativo (HIS)

Figura 10. Marcação nuclear sonda endógeno U6 (HIS)

Figura 11 A e B. Marcação miRNA-148a (HIS)

LISTA DE GRÁFICOS, TABELAS e QUADRO

Gráfico 1. Quantificação relativa média do miRNA-148a

Gráfico 2. Quantificação relativa média de MAFB

Gráfico 3. Quantificação relativa média do miRNA-148a em cultura de CMSP:
padronização do experimento *in vitro*

Gráfico 4. Quantificação relativa média do miRNA-148a em cultura de CMSP
sob estímulo de periodontopatógenos

Tabela 1. Características dos grupos de estudo

Tabela 2. Variação da expressão gênica de miRNAs na PC considerando a
gravidade da doença

Quadro 1. Anticorpos monoclonais fluorescentes utilizados para comprovação
da ativação celular

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ago2: proteína Argonauta 2

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato

CEO: Centro de Especialidades Odontológicas

cDNA: DNA complementar

c-Fos: proto-oncogene c-Fos

CMSP: células mononucleares do sangue periférico

CN: grupo controle

Ct: limiar de detecção a cada ciclo de amplificação

COEP: Comitê de Ética em Pesquisa

DEPC: pirocarbonato dietila

DGCR8: cofator do complexo denominado síndrome cromossomal *DiGeorge* região 8

Dicer: RNase III exonuclease

DIG: digoxigenina

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: solução de desoxinucleotídeos

DP: doença periodontal

Drosha: RNase III endonuclease

FFPE: material fixado em formaldeído e incluído em parafina

FO-UFMG: Faculdade de Odontologia UFMG

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IFN γ : interferon gama

IL-6: interleucina 6

IL-10: interleucina 10

IMF: índice médio de fluorescência

IPSEMG: Instituto de Previdência dos Servidores de Minas Gerais

IRAK-1: cinase associada ao receptor de interleucina 1

HIS: hibridização *in situ*

JNK : c-Jun N terminal

LNA: *Locked Nucleic Acid*

LPS: lipopolissacarídeo

MafB: molécula v-maf músculo aponeurótico fibrossarcoma oncogene
homologo B

MAFB: gene v-maf músculo aponeurótico fibrossarcoma oncogene
homologo B

miRNA: microRNA

mL: mililitros

MOI: multiplicidade de infecção

mRNA: RNA mensageiro

Mitf: fator de transcrição Mi

NBT: 4-nitro-azul-tetrazolium

NFATc1: fator nuclear de ativação de células T do tipo 1

NF-kB: fator nuclear kappa B

ng: nanogramas

RNA: ácido ribonucléico

RPM: rotações por minuto

OSCAR: receptor tipo imunoglobulina associado a osteoclasto

OPG: Osteoprotegerina

PA: periodontite agressiva

PC: periodontite crônica

PCR: reação em cadeia de polimerase

Pol II: RNA polimerase II

Pre-miRNA: microRNA precursor

Pri-miRNA: miRNA primário

qRT-PCR: PCR em Tempo Real quantitativo

RANKL: Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B

RANK: Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B

RISC: complexo de indução de silenciamento de RNA

RNA: ácido ribonucléico

RQ: quantificação relativa

RT-PCR: reação de transcrição reversa

SSC: solução de cloreto de sódio

STAT1: fator de transcrição, transdutor de sinal e ativador de transcrição

SOCS-3: supressor 3 de sinalização de citocina

TCLR: termo de consentimento livre e esclarecido

TCR: receptor de célula T

THP1: linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana

TLR: receptor tipo Toll

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TRAF-6: receptor associado ao fator 6 do fator de necrose tumoral

UFC: unidade formadora de colônia

UTR: região não traduzida

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

USA: Estados Unidos da América

°C: graus Celsius

μ g: microgramas

μ L: microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Doença Periodontal	15
1.2. Periodontite Crônica	17
1.3. Processo inflamatório e mecanismos de regulação da osteoclastogênese na Periodontite Crônica	18
1.4. Fatores genéticos e epigenéticos na Periodontite Crônica	20
1.5. MicroRNAs	22
1.6. MicroRNAs e resposta imune	25
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAS E MÉTODOS	30
4.1. Considerações Éticas	30
4.2. Seleção clínica das amostras	30
4.3. Seleção histológica das amostras	32
4.4. Delineamento dos experimentos	33
5. RESULTADOS	48
5.1. Perfil dos miRNAs na Periodontite Crônica	48
5.2. Quantificação relativa do miRNA-148a pela técnica de RT-qPCR TaqMan®	50
5.3. Quantificação relativa alvo do miRNA-148a (MafB)	51
5.4. Hibridização <i>in situ</i> (HIS)	52
5.5. Estudo <i>in vitro</i>: cultura de CMSP	55
6. Discussão	59
7. Conclusões	65
8. Referências	66

RESUMO

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de pequenos RNAs que não codificam proteínas cuja função é regular negativamente a expressão de genes através de regulação pós transcricional via degradação de RNA mensageiro alvo ou inibição da tradução do mesmo. Recentemente, alguns estudos têm demonstrado alterada expressão de miRNAs em várias doenças. No entanto, há poucos relatos na literatura sobre a expressão de miRNAs em periodontite. O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão de 84 miRNAs em tecidos gengivais de indivíduos com periodontite crônica (n = 6) e sem a doença (n=4). Oito miRNAs miRNA-148a-3p, miRNA-142-3p, miRNA-29b, miRNA-138-5p, miRNA-142-5p, miRNA-150-5p, miRNA-191-5p e miRNA-223-3p estavam aumentados nas amostras de periodontite crônica (PC). Dentre os miRNAs avaliados, a expressão miRNA148a-3p estava significativamente aumentada em todas as amostras PC inicialmente avaliadas em relação ao grupo sem a doença. Dessa maneira, a expressão gênica do miRNA-148a foi confirmada por PCR em Tempo Real (RT-qPCR) aumentando-se o número de amostras avaliadas para n = 17 tanto para o grupo caso quanto o grupo de comparação. Ao aumentar o número de amostras a quantificação relativa (RQ) média do miRNA-148a foi 17,24 enquanto o grupo controle 14,05, sendo esse resultado não estatisticamente significativo. Através da técnica de hibridação *in situ* (HIS), observou-se marcação para miRNA-148a, predominantemente, em tecido conjuntivo de fragmento de gengiva de indivíduos com PC. A expressão do alvo do miRNA-148a, *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homólogo B* (mafB), uma molécula reguladora da osteoclastogênese, foi avaliada, entretanto o resultado não foi estatisticamente significativo. O experimento de cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMSP)

com estímulos periodontopatogênicos demonstrou aumento da expressão de miRNA-148a quando estimulados com LPS de *P. gingivalis* e LPS de *A. actinomycetemcomitans*, cultivados por quatro horas. Em conclusão, os dados desse estudo destacam a possibilidade de envolvimento de miRNA-148a na patogênese da periodontite crônica e sua relação com periodontopatógenos. Estudos adicionais são necessários para demonstrar uma relação causal entre o miRNA-148a e seus alvos na PC, assim como seu papel na patogênese e gravidade da doença.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are short RNA molecules that negatively regulate gene expression by degrading target mRNA or inhibit the translation of protein. Recently, many reports have shown the altered miRNA expression in various diseases. However, there are few reports about miRNA expression on periodontitis. Initially, this study aimed to compare the expression of 84 miRNAs in gingival tissues from individuals without (n=4) and with chronic periodontitis (n=6). Eight miRNAs miR148a-3p, miR142-3p, miR29b, miR138-5p, miR142-5p, miR150-5p, miR191-5p and miR223-3p were significantly increased in the samples of chronic periodontitis (CP). Among the increased miRNAs, miRNA-148a-3p expression was higher in CP compared to C group. The miRNA-148a gene expression was confirmed by RT-qPCR (n=17). Media miRNA-148a relative quantification (RQ) was 17.24 while control group was 14.05. Through *in situ* hybridization (ISH), it was observed positive staining for miRNA-148a predominantly in connective tissue of gingival fragment with CP. Target of the miRNA-148a-3p, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (MAFB), a regulatory molecule of osteoclastogenesis, was evaluated and its result did not was statistically significant. The *in vitro* experiment showed increase miRNA-148a expression when stimulated with *P. gingivalis* LPS and *A. actinomycetemcomitans* LPS in PBMC cultivated for 4 hour. In conclusion, these data highlight the possibility of miR-148a involvement in chronic periodontitis pathogenesis. More studies are necessary to demonstrate a causal relationship between these miRNA and their target in periodontal diseases, as well as its role in the pathogenesis and severity of disease.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Periodontal

Periodonto corresponde ao conjunto de tecidos que circundam e suportam os dentes. Caracteriza-se como unidade funcional e estrutural do órgão dentário, sendo composto pela gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar (Figura 1). A gengiva corresponde ao periodonto de proteção e as demais estruturas ao periodonto de sustentação (LINDHE,1999).

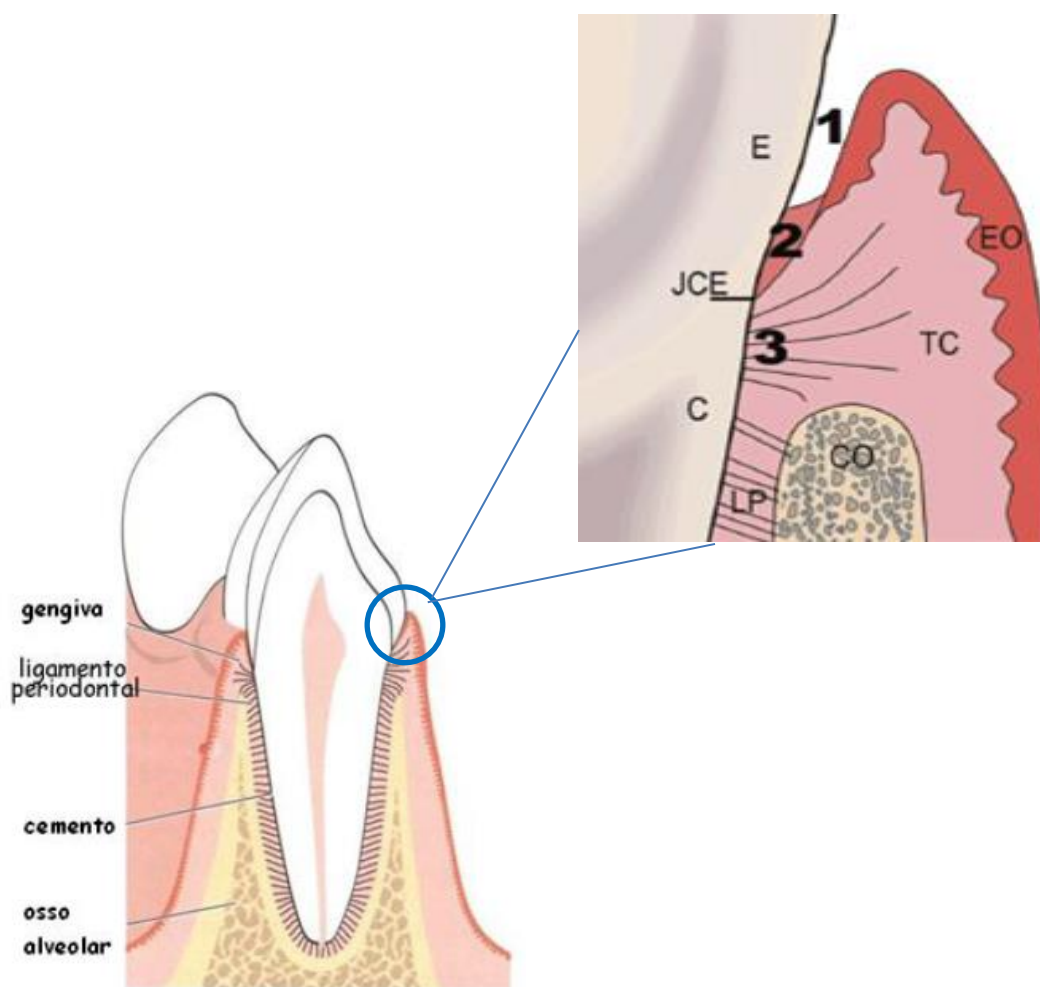


FIGURA 1. Anatomia do periodonto. Esmalte dentário (E); Junção cimento-esmalte (JCE); Cimento (C); Ligamento periodontal (LP); Crista óssea (CO); Tecido conjuntivo (TC); Epitélio oral (EO); Sulco gengival (1); Epitélio juncional (2); Inserção conjuntiva (3) (Fonte: LINDHE,1999 - Adaptado)

A doença periodontal (DP) é uma doença infecciosa caracterizada pela ocorrência de reação inflamatória, que pode levar a subsequente perda dos

tecidos de suporte dentário (SANZ *et al.*, 2011). O termo DP se refere tanto à gengivite quanto à periodontite. A gengivite é uma condição inflamatória restrita aos tecidos gengivais, em resposta à presença de biofilme bacteriano na superfície dental (KINANE & LINDHE, 1999). Caracteriza-se pela presença de sinais e sintomas de inflamação, tais como edema, vermelhidão, sangramento, dor ao toque e aumento do exsudato sem, contudo, haver perda de inserção. Tais alterações são reversíveis após a remoção do agente causal (KINANE & LINDHE, 1999).

A periodontite caracteriza-se por uma diversidade de manifestações que acometem o periodonto, tais como a migração do epitélio juncional, conseqüentemente, a formação de bolsa periodontal, além da destruição do tecido conjuntivo e do tecido ósseo adjacente (MOORE & MOORE, 1994). De acordo com a classificação das doenças periodontais, proposta por ARMITAGE (1999), duas principais formas clínicas de periodontites foram estabelecidas: periodontite crônica (PC) e periodontite agressiva (PA).

A PC apresenta uma taxa de progressão frequentemente baixa sendo caracterizada por surtos de atividade da doença. A mesma pode ser modificada ou estar associada a fatores locais, sistêmicos e, inclusive, a fatores comportamentais como o tabagismo (ARMITAGE, 1999). A PA difere da PC pela alta taxa de progressão que leva a uma avançada destruição periodontal associada à perda precoce do dente. A gravidade da destruição periodontal é incondizente com quantidade de agentes irritantes locais, tais como biofilme bacteriano e cálculo dentário, podendo ocorrer tanto de maneira localizada quanto generalizada (ARMITAGE, 1999; CALIFANO, 2003).

1.2 Periodontite crônica

A PC é a forma de periodontite mais comum na população adulta, correspondendo a maior causa de perda dental nessa faixa etária. Entretanto, a PC também pode acometer indivíduos jovens (PAGE & SCHROEDER, 1997). A presença de irritantes locais é compatível com a gravidade da doença e a taxa de progressão é normalmente baixa ou moderada e parece não ocorrer de forma contínua, mas de maneira episódica, em pequenos períodos de atividade, seguidos por longos períodos de inatividade (LINDHE *et.al.*, 1989; ARMITAGE, 1999).

A PC possui etiologia primária advinda de bactérias específicas, predominantemente, anaeróbias Gram negativas (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994), que formam um biofilme bacteriano que possibilita a permanência dos patógenos nas superfícies dos dentes e no ambiente da bolsa periodontal (MARTINS, 1997). Essa permanência dos patógenos junto aos tecidos periodontais determinam uma inflamação persistente que culmina na destruição das estruturas de suporte dentário (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992).

Em 1998, SOCRANSKY *et al.* descreveram as principais bactérias relacionadas ao desenvolvimento das doenças periodontais, agrupando-as em cinco complexos diferentes, denominados complexo laranja, complexo roxo, complexo vermelho, complexo verde e complexo amarelo. Dentre esses grupos, o complexo vermelho, formado por *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, é descrito como sendo o de maior relevância para o desenvolvimento das periodontites por estar relacionado à formação das bolsas periodontais. Entretanto, devido ao caráter de sinergismo presente nas relações de sucessão ecológica entre esses complexos bacterianos, outros microrganismos também se mostram

importantes para o desenvolvimento das alterações periodontais como o *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), que é um representante do complexo verde, bem como *Prevotella nigrescens*; *Eikenella corrodens*; *Fusobacterium nucleatum*; *Campylobacter rectus* e *Prevotella intermedia*.

1.3 Processo inflamatório e mecanismos de regulação da osteoclastogênese na Periodontite crônica

O processo inflamatório desencadeado pela presença dos periodontopatógenos, apesar de agir nos tecidos periodontais para proteger o indivíduo contra a invasão bacteriana, pode ser prejudicial ao danificarem as células e estruturas do periodonto devido à complexa interação entre os patógenos e o sistema de defesa do hospedeiro (PAGE & SCHROEDER, 1997). Nos períodos de atividade da doença, tem sido observada grande produção de importantes mediadores da resposta inflamatória, tais como uma diversificada rede de citocinas, quimiocinas, e ativação do sistema do complemento que estão associadas a cronicidade e a progressão da doença (MOREIRA *et al.*, 2009). Tais mediadores inflamatórios desencadeiam processos envolvidos na degradação de matriz extracelular, bem como na ativação de osteoclastos, caracterizando a destruição dos tecidos de suporte dentário (GARLET *et al.*, 2004).

O mecanismo de reabsorção óssea possui múltiplas etapas que incluem proliferação de precursores dos osteoclastos imaturos, diferenciação e maturação celular e, finalmente, a degradação de matrizes orgânicas e inorgânicas do tecido ósseo (TEITELBAUM, 2000). A osteoclastogênese é regulada por uma cascata de eventos que envolvem a participação de

moléculas e citocinas pró-inflamatórias, bem como do eixo RANK (Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B), RANKL (Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B), OPG (Osteoprotegerina) (KOBAYASHI, 2009). O RANK é um receptor transmembrana do tipo I, membro da família de Fator de Necrose Tumoral (TNF), primariamente expresso em células da linhagem dos monócitos e macrófagos, dentre eles os precursores dos osteoclastos, além de células B e T, células dendríticas e osteoblastos (TAKAYANAGI, 2007).

O RANKL é uma proteína necessária e importante na osteoclastogênese, pois se liga ao RANK presente na superfície dos pré-osteoclastos e osteoclastos, estimulando a diferenciação dos pré-osteoclastos e a ativação dos osteoclastos maduros. RANKL induz a ativação e indução de fatores de transcrição, incluindo fator nuclear kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), fator de transcrição *Mi* (Mitf), fator nuclear de ativação de células T do tipo 1 (NFATc1) e c-Fos que favorecem a osteoclastogênese (KIM, *et al.*, 2007).

O processo de reabsorção óssea via RANKL é em parte regulado pela molécula OPG. Esta se liga com alta afinidade a molécula RANKL, impedindo sua ligação a RANK, conseqüentemente, levando a diminuição da osteoclastogênese. Outras moléculas como MafB, denominada v-maf músculo aponeurótico fibrossarcoma oncogene homologo B, também auxiliam na regulação da osteoclastogênese via RANKL. Na ausência de RANKL, MafB interage com os fatores de transcrição Mitf e c-Fos, impedindo que genes precursores de osteoclastogênese como NFATc1 e receptor tipo imunoglobulina associado a osteoclasto (OSCAR) sejam expressos. Com o estímulo de RANKL os níveis de transcrição do gene *MAFB* são diminuídos via mecanismos de interação com c-Jun N terminal (JNK) e p38 cinases

desencadeando o processo de reabsorção óssea (KIM *et al.*, 2007; TANAHASHI *et al.*, 2010) (Figura 2).

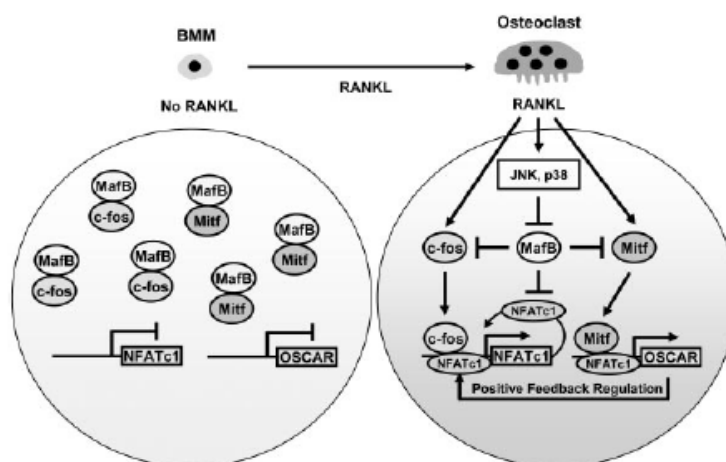


FIGURA 2. Modelo esquemático do papel da molécula MafB na regulação da osteoclastogênese. MafB encontra-se abundante nas células hematopoéticas e desempenha papel de regulador negativo da osteoclastogênese, pois impede a ação dos fatores de transcrição Mitf e c-fos, ambos estimuladores de osteoclastogênese. Na presença de RANKL MafB é inibida, permitindo o desencadeamento da osteoclastogênese. Células da medula hematopoética (BMM); Cinases (JNK) (p38); Fatores de transcrição (c-fos) (Mitf) (NFATc1); Genes desencadeadores de osteoclastogênese (NFATc1) (OSCAR) (Fonte: KIM *et al.*, 2007)

1.4 Fatores genéticos e epigenéticos na Periodontite crônica

O processo de desencadeamento da periodontite crônica mostra-se bastante complexo, uma vez que é influenciado pela natureza e patogenicidade dos microrganismos, por fatores genéticos inerentes ao hospedeiro e pelas influências ambientais as quais o indivíduo está submetido (BORRELL *et al.*, 2005; TAKASHIBA *et al.*, 2006). Estudos demonstram que indivíduos com características clínicas semelhantes e fatores de risco envolvidos respondem de forma diferente a um mesmo tratamento empregado, o que pode indicar a importância dos componentes genéticos e epigenéticos do hospedeiro no desfecho da doença (OFFENBACHER *et al.*, 2008). Estudos já demonstraram exaustivamente que variações genéticas, tais como os polimorfismos gênicos, estão envolvidos na predisposição às doenças inflamatórias, assim como à PC

(YAMAZAKI *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2005; BABEL *et al.*, 2006; TERVONEN *et al.*, 2007).

O termo epigenética refere-se a todas as mudanças herdáveis do genoma funcional que não alteram as sequências de nucleotídeos do DNA (FEINBERG, 2007). As bases moleculares dos processos epigenéticos são complexas e envolvem a metilação do DNA, modificação de histonas e regulação gênica por RNAs não codificadores de proteínas (BAYARSAIHAN, 2011). Tais modificações podem ser hereditárias ou adquiridas ao longo da vida de um indivíduo. Fatores como tabagismo, obesidade, diabetes, envelhecimento e toxinas podem contribuir para alterações dinâmicas na modulação epigenética (OFFENBACHER *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2009). Atualmente, tem se destinado maior atenção as alterações epigenéticas na tentativa de melhor entendê-las, por se tratarem de alterações potencialmente reversíveis, estão passíveis de criação de propostas terapêuticas alternativas para as doenças (BAYARSAIHAN, 2011).

Atribui-se à presença dos periodontopatógenos o potencial de provocar modificações epigenéticas nos tecidos periodontais (BOBETSIS *et al.*, 2007). Entretanto, não se sabe se as alterações epigenéticas ocorrem devido a uma interação bacteriana direta com os tecidos ou como consequência à resposta inflamatória do hospedeiro (BOBTESIS *et al.*, 2007). As principais evidências relacionadas às alterações epigenéticas na PC restringem-se à análise do perfil de metilação em genes relacionados à doença (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; AMORMINO *et al.*, 2013).

Até o presente momento, pouco se sabe sobre o papel da regulação gênica nos processos inflamatórios desempenhados por outros mecanismos epigenéticos, como a atuação dos miRNAs na PC (BAYARSAIHAN, 2011).

1.5 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) fazem parte de um grande grupo de pequenos RNAs endógenos, não codificadores de proteínas que exibem, aproximadamente, de 18 a 24 nucleotídeos. Esses miRNAs agem impedindo a tradução de RNAs mensageiros (mRNAs) alvos e, em decorrência, são caracterizados como reguladores negativos que atuam na fase pós transcricional (BARTEL, 2004; GARTEL, 2006; ZHANG *et al.*, 2007, WU *et al.* 2011).

Os primeiros miRNAs descobertos foram identificados em nematódeos da espécie *Caenorhabditis elegans*, em 1993 (AMBROS *et al.*, 1993; MACK, 2007). Atualmente, mais de 1500 diferentes miRNAs da espécie humana já foram registrados em banco de dados (HANEKLAUS *et al.*, 2013).

Estudos têm demonstrado que os miRNAs possuem importantes atividades biológicas devido sua capacidade de regular de 20 a 60% de todos os genes humanos, sendo que um único miRNA é capaz de regular vários genes (AMBROS, 2004; HARFE, 2005; JOHNSON *et al.*, 2005; PLASTERK, 2006; SLACK *et al.*, 2006; LOA *et al.*, 2007; SAYED & ABDELLATIF, 2011). Desta maneira, atualmente, um dos maiores desafios é entender as específicas funções biológicas de cada miRNA (GREENE *et al.*, 2010).

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) (GREGORY *et al.*, 2005; HABER *et al.*, 2006; SLACK *et al.*, 2006; HUPPI, K. *et al.*, 2007; MACK, 2007).

O pre-miRNA é exportado para o citoplasma pelo fator nuclear de exportação (exportina-5), sendo, então, processado pela enzima Dicer (RNase III), resultando em um miRNA maduro e de dupla fita, contendo de 18-24 nucleotídeos. Apenas uma das fitas do miRNA maduro é incorporada ao complexo de indução de silenciamento de RNA (RISC), formando o mi-RISC que de fato desempenha a função de regulação gênica. Frequentemente, a segunda fita de miRNA é degradada (BARTEL, 2004; GARZON *et al.*, 2006; HABER *et al.*, 2006; HUPPI *et al.*, 2007; MACK, 2007) (Figura 3).

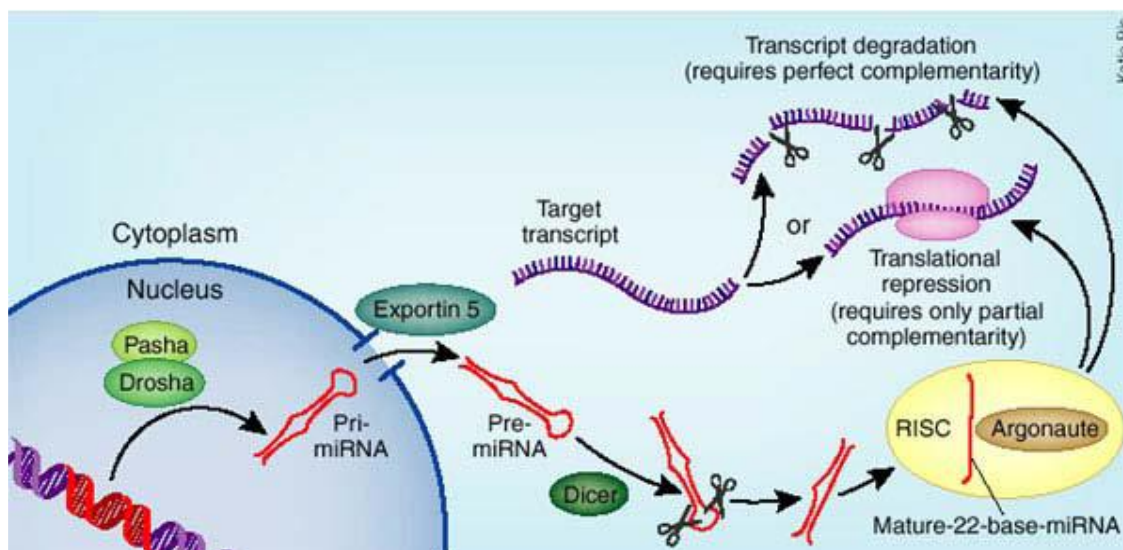


FIGURA 3. Biogênese dos microRNAs. O miRNA primário (pri-miRNA) é transcrito a partir de gene específico. Ainda no núcleo da célula, este é processado pela enzima Drosha e exportado para o citoplasma onde, então, é processado pela enzima Dicer. Após a separação da fita dupla de miRNA, uma das fitas se associa ao complexo de indução de silenciamento de RNA (RISC) e reprime a síntese de proteínas quer seja por degradação ou silenciamento do mRNA alvo (Fonte: MACK, 2007).

Os reais mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica através do complexo mi-RISC ainda não foram completamente elucidados. Estudos demonstram que, uma vez formado o complexo, este interage frequentemente na região 3' não traduzida (3'UTR) do mRNA alvo, causando silenciamento ou degradação do mesmo (PAULEY *et al.*, 2009). CARTHEW &

SONTHEIMER (2009) propuseram alguns mecanismos de ação para o complexo mi-RISC (Figura 4). Segundo os autores, quando a inibição da tradução ocorre em momentos iniciais do processamento do mRNA, identificam-se três distintos mecanismos de ação. No primeiro, é proposto que mi-RISC impeça o reconhecimento da região CAP, inviabilizando a tradução (Figura 4b); no segundo, sugere-se que o complexo atue sobre alguns fatores de iniciação da tradução (eIF6), impossibilitando o acoplamento das subunidades ribossomais (Figura 4c); ou ainda, é proposto que o complexo promova a deadenilização do mRNA, impedindo que esta molécula tome sua conformação circular e, conseqüentemente, dificulte a tradução (Figura 4d). Outro mecanismo descrito é o bloqueio da continuidade da elongação da tradução causado pela indução prematura do desacoplamento das subunidades ribossomais (Figura 4e). E, finalmente, sugere-se que mi-RISC atue causando clivagem direta do mRNA (Figura 4f) por meio de deadenilação, seguida de remoção da molécula CAP que confere estabilidade ao mRNA. Esta degradação se dá através da presença da proteína Argonauta 2 (Ago2) que associada ao complexo mi-RISC pode causar a completa destruição do mRNA (OSADA *et al.*, 2007; PAULEY *et al.*, 2009; CARTHEW & SONTHEIMER, 2009).

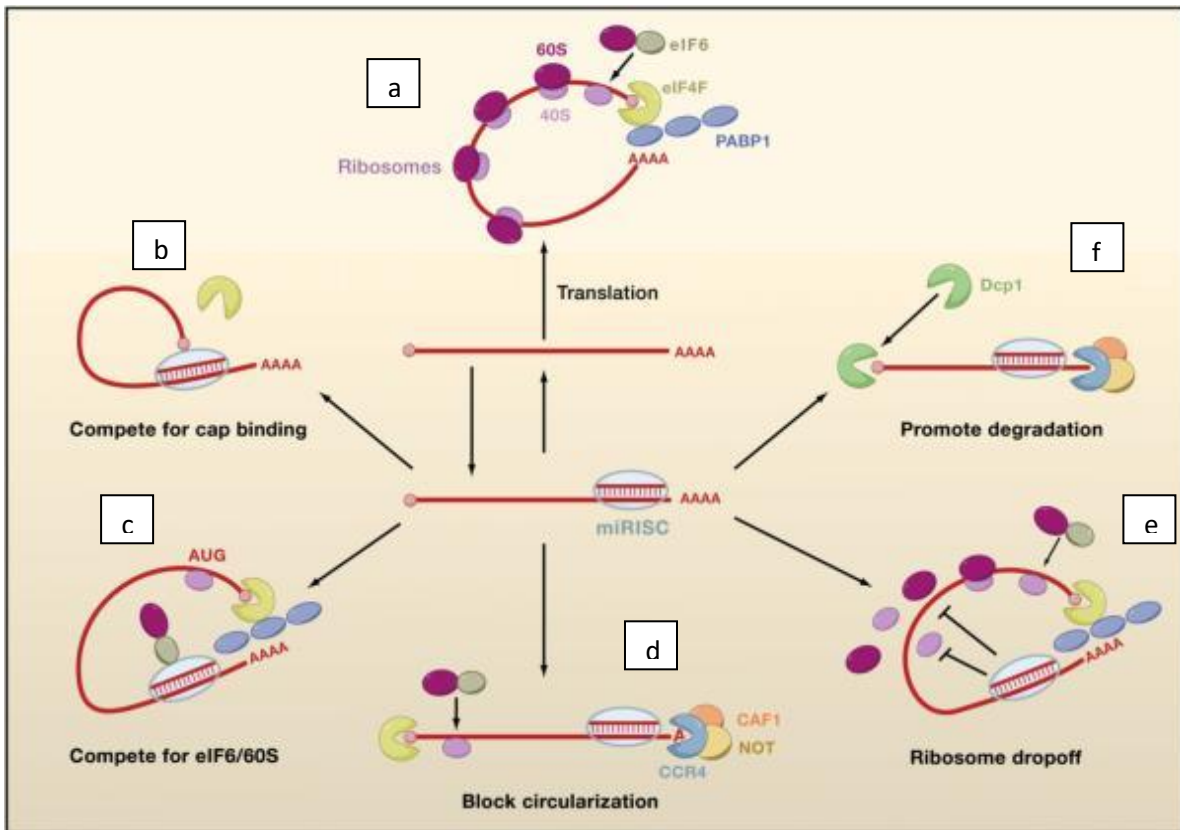


FIGURA 4. Possíveis mecanismos de regulação gênica pós transcricional desempenhada pelos miRNAs. Ausência de mi-RISC (a); impedimento do início da tradução (b,c,d); bloqueio da continuidade da tradução (e); degradação direta do mRNA alvo (f) (Fonte: CARTHEW & SONTHEIMER, 2009 - Adaptada).

1.6 miRNAs e a resposta imune

As funções biológicas dos miRNAs nos mecanismos de inflamação e imunidade tem sido muito exploradas, uma vez que representam um importante alvo para potenciais agentes diagnósticos e terapêuticos (MACK, 2007). Vários miRNAs possuem funções que podem estar relacionadas aos mecanismos de inflamação exibidos na PC. Segundo LU *et al.* (2009), os miRNAs possuem importantes funções na diferenciação das linhagens de linfócitos T auxiliares e nas funções desempenhadas por estes linfócitos. A resposta imune mediada por linfócitos T tem sido associada com a expressão de específicos miRNAs, dentre eles o miRNA-150 e miRNA-223 (ZHOU *et al.*, 2007; HANEKLAUS *et al.*, 2013).

O miRNA-146a foi identificado como fundamental para regulação da imunidade inata. Estudo em linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana (THP1) demonstrou que este miRNA possui função fundamental na sinalização induzida por receptores tipo *Toll* (TLR) (TAGANOV *et al.*, 2006). RODRIGUEZ *et al.* (2007) demonstraram que ratos com deficiência do miRNA-155 exibem células dendríticas com falhas na capacidade de apresentação de antígenos aos linfócitos T.

Alguns miRNAs têm sido relacionados à regulação de algumas das citocinas que possuem íntima relação com o desencadeamento da PC. O miRNA-106a foi identificado como sendo um regulador direto da citocina IL-10 (SHARMA *et al.*, 2009). O miRNA-203 está relacionado a regulação de doenças inflamatórias por ter como alvo direto a proteína SOCS3 (Supressor 3 de sinalização de citocina). Esta proteína é um regulador negativo dos mecanismos de sinalização induzidos por IL-6 e IFN- γ . SUN *et al.* (2011) demonstraram que o miRNA-142 desempenha papel importante na regulação da produção da citocina IL-6 por células dendríticas, após estímulo com lipopolissacarídeos (LPS).

Alguns miRNAs já foram identificados como importantes reguladores gênicos frente à presença de bactérias específicas. Dentre eles podemos citar o miRNA-146, miRNA-155, miRNA-125, miRNA-let-7 e o miRNA-21 que auxiliam na proteção do hospedeiro contra invasões bacterianas (STAEDEL & DARFEUILLE, 2013).

Também já foi descrita relação direta entre miRNAs e regulação de atividade osteogênica. A inibição do miRNA-138 favoreceu a expressão de genes específicos da osteogênese, além da atividade de fosfatase alcalina, permitindo a mineralização da matriz óssea (ESKILDSEN *et al.*, 2011). CHENG

et al. (2013) validaram, experimentalmente, a importância do miRNA-148a na modulação da osteoclastogênese. Foi demonstrado que o silenciamento do miRNA-148a inibe a perda óssea. O miRNA-148a possui como alvo a molécula MafB. Esta atua como importante regulador negativo da osteoclastogênese, pois sua presença impede que os fatores de transcrição Mitf e c-Fos se liguem nas regiões promotoras dos genes NFATc1 e OSCAR, inibindo assim a transcrição dos mesmos e, conseqüentemente, reduzindo a osteoclastogênese. (KIM *et al.*, 2007).

Até o presente momento, são escassos os estudos sobre a influência dos miRNAs na doença periodontal (STOECKLIN-WASMER *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2011; XIE *et al.*, 2011). Estudos adicionais são necessários para entender a influência dos miRNAs na PC.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a natureza complexa e multifatorial da doença periodontal, é possível assumir que outros fatores, como os eventos epigenéticos e dentre eles a regulação por miRNAs, possam influenciar a resposta imune e inflamatória do hospedeiro e interferir no estabelecimento e na progressão da doença. Embora já tenha sido estabelecido que alguns mecanismos genéticos sejam fatores predisponentes à doença periodontal, pouco se sabe sobre os efeitos epigenéticos na inflamação. Até o presente momento, não foi estabelecida a influência dos miRNAs na resposta inflamatória da PC. Poucos trabalhos propuseram estudar miRNAs na doença periodontal (STOECKLIN-WASMER *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2011; XIE *et al.*, 2011). E dentre eles, nenhum correlacionou a presença dos miRNAs com parâmetros clínicos da doença, ou avaliou quais seriam os possíveis alvos dos miRNAs mais relevantes para a doença, ou mesmo tentou estabelecer análises funcionais. Tendo em vista a escassez de informações sobre miRNAs na PC, estudos são necessários para estabelecer o real papel desempenhado por esses reguladores gênicos em relação aos mecanismos da resposta imune e inflamatória na doença. Desta maneira, os dados deste estudo poderão ser úteis no direcionamento de novos estudos que futuramente permitirão o surgimento de propostas diagnósticas e terapêuticas alternativas para a PC a partir da utilização de ferramentas moleculares.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ∅ Avaliar a expressão de miRNAs relacionados ao processo inflamatório da PC, comparando indivíduos com e sem a doença.

3.2 Objetivos específicos

- ∅ Identificar e correlacionar os miRNAs mais expressos com parâmetros clínicos e histológicos da doença.
- ∅ Identificar, dentre os miRNAs mais expressos, aquele mais relacionado à patogênese da PC e avaliar a sua expressão.
- ∅ Identificar um possível alvo para o miRNA mais expresso na PC que possa ter influência na doença e avaliar a sua expressão.
- ∅ Realizar a localização tecidual do miRNA mais expresso em fragmentos de tecido gengival.
- ∅ Avaliar *in vitro* a influência de bactérias periodontopatogênicas na expressão do miRNA mais expresso.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

Este estudo foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovado sob o número CAAE – 01311912.3.3001.5140 (ANEXO A). As amostras foram coletadas na Clínica Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG); no Centro de Especialidades Odontológicas (CEO) da Prefeitura Municipal de Ribeirão das Neves – MG, mediante autorização do Comitê de Ética da Secretaria Municipal de Saúde e no Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas Gerais (IPSEMG), também mediante autorização da Coordenação de Saúde Bucal.

Os participantes foram devidamente informados sobre os métodos e objetivos da pesquisa, sendo incluídos na amostragem apenas os indivíduos que autorizaram sua participação mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO B e C). Todos os participantes do estudo também responderam a uma ficha clínica (ANEXO D), que teve por finalidade realizar o estadiamento da doença e/ou obter dados acerca da condição sistêmica dos mesmos.

4.2 Seleção Clínica das Amostras

Após a anamnese, foram realizados os exames clínicos, considerando os parâmetros periodontais de sangramento à sondagem (SS), nível de inserção clínica (NIC) e profundidade de sondagem (PS). A sondagem foi realizada percorrendo todo sulco gengival com a sonda periodontal e, para os parâmetros PS e NIC, foi registrado o maior valor encontrado nas superfícies vestibular, mesial, distal e lingual/palatina de todos os dentes presentes. Os

dados referentes ao SS foram registrados para todas as superfícies de todos os dentes, no momento da sondagem ou até 60 segundos após, sendo anotada de forma dicotômica, como presença (+) ou ausência (-) de sangramento. Os exames foram realizados em condições adequadas de iluminação e infra-estrutura, obedecendo às normas de biossegurança. Os parâmetros clínicos periodontais foram mensurados com o auxílio de sonda milimetrada (modelo Carolina do Norte Hu-friedy®) e espelho bucal.

Foram excluídos os indivíduos que relataram uso de antibiótico ou anti-inflamatório nos 6 meses anteriores à coleta, ou em uso contínuo de medicações que apresentam associação com crescimento gengival; ou ainda, portadores de diabetes; osteoporose; doenças inflamatórias crônicas, salvo aqueles portadores de PC; fumantes; grávidas ou lactantes.

Os participantes foram alocados em dois grupos de acordo com os critérios descritos abaixo.

4.2.1 Grupo Controle (CN) – Periodonto clinicamente sadio

Composto por indivíduos com boa saúde geral cujas amostras de tecido foram coletadas de sítios com ausência de PS > 3mm e ausência de sinais clínicos de inflamação. Tais indivíduos apresentavam no mínimo 24 dentes e menos de 25% dos sítios com sangramento à sondagem. As amostras foram coletadas a partir de áreas submetidas à exodontia de pré-molares por indicação ortodôntica ou em região contra-lateral à invasão do espaço biológico, em cirurgias de aumento de coroa clínica, em dentes sem alteração de profundidade de sondagem no sítio selecionado para coleta.

4.2.2 Grupo Doente (PC) - Periodontite crônica

Para caracterização do grupo PC, os parâmetros utilizados foram a presença de 4 ou mais dentes com 1 ou mais superfícies contendo PS \geq 4mm e

NIC \geq 3 mm (LÓPEZ *et al.*, 2002; ARMITAGE, 2004). Quanto à gravidade da doença periodontal, consideramos PS > 4mm e < 7mm periodontite moderada e PS > 7mm, periodontite grave, conforme descrito previamente por TREVILATTO *et al.* (2003). As amostras foram coletadas a partir de áreas submetidas à cirurgia periodontal de raspagem em campo aberto ou exodontias de dentes com prognóstico periodontal desfavorável.

4.3 Seleção Histológica das Amostras

Foi selecionado um total de 65 indivíduos que atendiam aos critérios de inclusão. Todos esses indivíduos foram submetidos a avaliações clínicas que os classificaram em portadores de PC ou saudáveis (CN). Uma vez definidos os grupos, foram coletadas amostras de tecido gengival dos mesmos. Parte do tecido gengival coletado destinou-se à análise histológica de forma que todos os indivíduos, mesmo após serem classificados clinicamente, tiveram suas amostras de tecido gengival submetidos a uma criteriosa avaliação histológica que definiu de fato a inclusão ou não da amostra no estudo.

Somente foram incluídos no estudo indivíduos classificados como portadores de gengiva saudável clinicamente, mas que histologicamente exibiam até no máximo um escasso infiltrado inflamatório em sua lâmina própria. O mesmo rigor também foi adotado para o grupo de indivíduos doentes. Estes, além de respeitarem todos os critérios de classificação clínica para a PC, também só foram incluídos no estudo caso apresentassem intenso infiltrado inflamatório.

Ao final da seleção histológica obtivemos 34 indivíduos cujas características estão organizadas na Tabela 1.

TABELA 1. Características dos grupos de estudo

	Periodontite Crônica <i>n</i> = 17	Controle <i>n</i> =17
Sexo		
Masculino	8 (47,06 %)	7 (41,18 %)
Feminino	9 (52,94 %)	10 (58,82 %)
Idade mediana em anos*	45 (27-75)	37 (18-56)

*Não foi observada diferença estatisticamente significativa para as idades dos pacientes entre os grupos avaliados.

4.4 Delineamento dos Experimentos

O delineamento dos experimentos com a metodologia empregada em cada etapa do trabalho foi descrita e agrupada de acordo com os objetivos do estudo. A figura 5 representa o fluxograma dos experimentos realizados.

4.4.1 Fluxograma dos experimentos

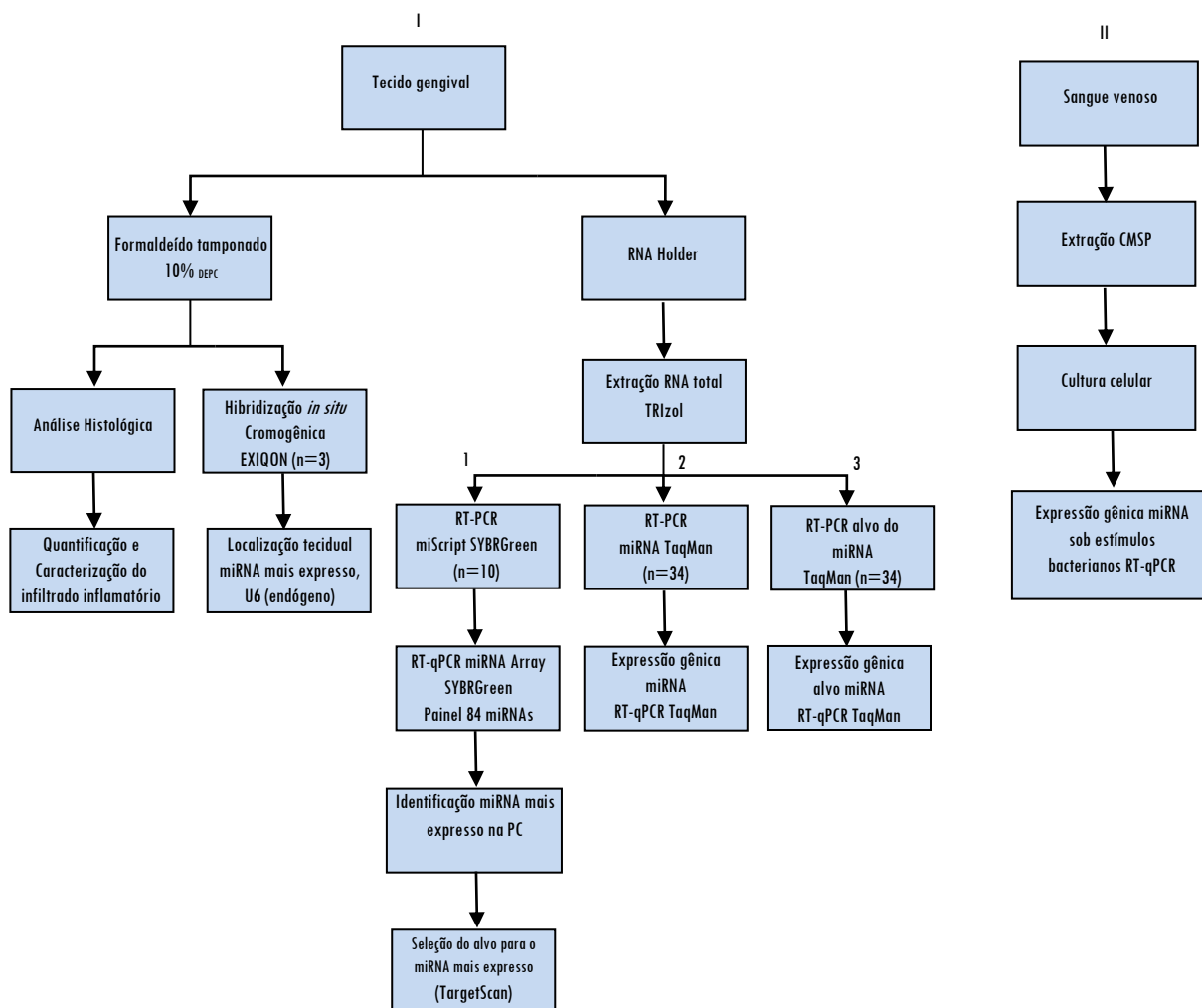


FIGURA 5. Fluxograma dos experimentos utilizados no estudo. DEPC: pirocarbonato de dietila; CMSP: células mononucleares do sangue periféricas; RT-PCR: transcrição reversa por reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa.

4.4.2 Com a finalidade de traçar o perfil de miRNAs na PC e avaliar histologicamente as amostras a serem incluídas do estudo, foram utilizados os seguintes materiais e métodos.

4.4.2.1 Coleta do Fragmento Gengival

As amostras de tecido gengival obtidas durante os procedimentos cirúrgicos foram divididas em três partes. A primeira parte foi acondicionada em formaldeído tamponado _{DEPC} 10% para processamento de rotina e posterior análise quantitativa e qualitativa do infiltrado inflamatório por coloração de eosina/hematoxilina (HE). A segunda parte destinou-se à análise de hibridização *in situ* para localização tecidual dos miRNAs, para algumas amostras (n=3). E uma terceira parte tecidual foi armazenado em *RNAHolder* (BioAgency) e mantido congelado a -80°C até a extração do RNA para as análises de expressão gênica.

4.4.2.2 Análise Histológica

Os tecidos fixados em formaldeído tamponado _{DEPC} 10% foram incluídos em parafina, submetidos a cortes histológicos de 6 µm, confecção de lâminas e coloração por hematoxilina/eosina (HE) para exame histopatológico. A partir dos cortes, foram realizadas contagem e caracterização das células inflamatórias em polimorfonucleares ou mononucleares, usando um microscópio (Olympus®, BX51, America Inc.) com um aumento de 400x e uma interface para computador. As contagens foram feitas por um único examinador. O valor da mediana relativo à contagem das células inflamatórias foi determinado pelo número de células inflamatórias na lâmina própria em campos consecutivos, utilizando o *software Image Tool* (versão 3.0, da Universidade do Texas *Health Science Center*, San Antonio, TX).

4.4.2.3 Extração de RNA Total

Os fragmentos de tecido gengival acondicionados em *RNAHolder* foram submetidos à extração de RNA total, segundo o protocolo recomendado pelo fabricante do reagente TRIzol® (*Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA*), sendo as alíquotas de RNA armazenadas à temperatura de -80°C. Essas amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop (ND-1.000) cuja pureza foi 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 agarose 1,5%, utilizando-se 1µg de cada RNA extraído, revelado em solução brometo de etídio e analisado em transluminador de UV.

4.4.2.4 PCR Array

Primeiramente, a avaliação da expressão dos microRNAs foi realizada em amostras de PC ($n=6$) e CN ($n=4$) através do *kit miRNA PCR Array Human Immunopathology MIHS-104Z* (Qiagen®), permitindo-nos identificar simultaneamente 84 miRNAs relacionados aos mecanismos imunoinflamatórios.

Essa técnica baseou-se na conversão de 250 ng de RNA total em cDNA pelo *kit miScript II® RT*. O cDNA convertido foi adicionado aos reagentes Quantitect SYBR® Green PCR Master Mix e miScript Universal primer (SABiosciences, Qiagen®, Chatsworth, CA). Alíquotas de 25µL desse mix foram distribuídas pela placa miRNA PCR array Human Immunopathology® MIHS-104Z (Figura 6), seguida de corrida em termociclador CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, USA), sob as condições 15 minutos a 95°C, 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 70°C por 40 ciclos. Os dados obtidos foram analisados utilizando Qiagen® *data analysis software*

(SABiosciences, Qiagen®, Chatsworth, CA). A quantificação relativa dos miRNAs foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Let7a	Let7c	Let7d	Let7e	Let7g	miR103a	miR105	miR125a	miR125b	miR126	miR129	miR130a
B	miR132	miR134	miR135a	miR135b	miR138	miR142 3p	miR142 5p	miR143	miR145	miR146a	miR147	miR148a
C	miR149	miR150	miR152	miR155	miR15a	miR15b	miR16	miR17	miR181a	miR182	miR183	miR184
D	miR185	miR186	miR187	miR18a	miR18b	miR191	miR194	miR195	miR196a	miR19a	miR19b	miR200a
E	miR203	miR205	miR206	miR20a	miR20b	miR21	miR210	miR214	miR223	miR23b	miR26a	miR26b
F	miR27a	miR27b	miR298	miR299	miR29b	miR29c	miR302a	miR30b	miR30c	miR30e	miR31	miR325
G	miR335	miR34a	miR363	miR379	miR383	miR409	miR451	miR493	miR574	miR9	miR98	miR99b
H	Ce	Ce	SN1	SN2	SN3	SN4	SN5	SN6	miRTC	miRTC	PPC	PPC

FIGURA 6. Modelo placa PCR Array. Lista de todos os 84 miRNAs avaliados. Ce: controle negativo (*primer* miRNA-39 *C. elegans*); SN1-6: endógenos (*primers* snoRNA/snRNA); miRTC: controle da reação de transcrição reversa; PPC: controle positivo da PCR.

A partir da identificação do perfil de miRNAs na PC em relação ao controle foi possível identificar os miRNAs mais expressos nas amostras de PC. Através de buscas no banco de dados *TargetScan 6.0 Human* (<http://www.targetscan.org>) e revisão em literatura foi possível selecionar um alvo do miRNA mais expresso nas amostras PC que possivelmente fosse relevante para a patogênese da PC.

4.4.3 Com a finalidade de avaliar o miRNA mais expresso para a PC (miRNA-148a) e avaliar a expressão do seu alvo (MafB) foram utilizados os seguintes materiais e métodos.

4.4.3.1 Transcrição Reversa

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA total extraído das amostras via transcrição reversa utilizando *kits* específicos para cada alvo avaliado.

A escolha dos endógenos RNU48, para a reação do miRNA-148a e β -actina para reação do MAFB foi estabelecida a partir de testes que verificaram que ambos apresentam expressão regular em diferentes tecidos, conforme sugerido pela fabricante *Applied Biosystems*.

∅ *Transcrição reversa do miRNA-148a e RNU48*: nessa etapa foi utilizado o kit *TaqMan® MicroRNA RT (Applied Biosystems Foster City, CA)* para produção do mix, contendo para cada amostra: 0,15 μ L de dNTP; 1,0 μ L de enzima transcriptase reversa (RT enzima); 1,5 μ L de tampão; 0,19 μ L de inibidor de RNase; 4,16 μ L de água livre de RNase e 3,0 μ L *primer* de transcrição reversa (RT primer) que é específico para cada alvo.

Foi adicionado 5 μ L de amostra de RNA (10 ng de RNA total) ao volume de 10 μ L do mix obtendo-se um volume final de reação de 15 μ L. 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),

Essa técnica baseia-se na utilização de um *primer* com estrutura do tipo *stem-loop* (Figura 7). Essa conformação é para solucionar um ponto crítico em relação à detecção do miRNA maduro, que é o seu

pequeno tamanho. 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.

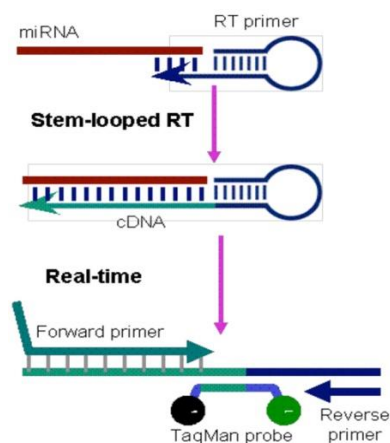


FIGURA 7. Representação esquemática do *Stem-looped RT primer* TaqMan[®] para identificação de miRNAs

φ *Transcrição reversa de MafB e β-actina*: 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*), seguindo as recomendações do fabricante.

Uma vez tratadas, as amostras foram submetidas à reação de transcrição reversa pelo *kit SuperScriptTM 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

fabricante. O cDNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (ND-1.000) e armazenado a -20°C.

4.4.3.2. PCR em Tempo Real quantitativa

⊖ *Análise da expressão gênica do miRNA-148a e RNU48:* 18 µL de mix, contendo 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) foi 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 condições de reação foram 50°C por 2 minutos (ativação da inicial da polimerase), seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 minutos (desnaturação), 95°C por 15 minutos (anelamento), 60°C por 1 minuto (extensão). Todo o estudo foi realizado em duplicata.

⊖ *Análise da expressão gênica de MAFB e β-actina:* a reação foi padronizada com 200 ng de cDNA em volume final de reação de 20 µL nas condições recomendadas pelo fabricante, correspondendo a 95°C por 10 minutos (desnaturação), 95°C por 15 minutos (anelamento), 60°C por 1 minuto (extensão) em 40 ciclos. Todas as reações foram realizadas em duplicata e em termociclador CFX96 Real-Time PCR (*Bio-Rad Laboratories*, USA).

O cálculo da expressão gênica relativa foi realizado pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrita por SCHMITTGEN & LIVAK (2001), também denominado de método Ct comparativo, uma vez que o teste de eficiência dos *primers* indicou eficiência de 100%.

Esse método de quantificação relativa descreve a mudança na expressão do gene alvo nas amostras experimentais (PC e CN) em relação ao grupo de referência (*pool* calibrador), normalizadas por um gene endógeno. (Applied Biosystems User Bulletin n.º 2 – P/N 4303859 - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Para as análises de expressão gênica, a amostra de referência foi constituída por *pool* de 5 amostras de células mononucleares do sangue periférico provenientes de indivíduos clinicamente saudáveis.

4.4.4 Com a finalidade de realizar a localização tecidual do miRNA mais expresso na PC, foram utilizados os seguintes materiais e métodos.

4.4.4.1 Hibridização *in situ* (HIS)

A técnica de HIS foi realizada com sondas específicas para detecção do miRNA-148a e do miRNA endógeno U6 a partir do *kit miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization (FFPE)* (EXIQON®) que possui sondas duplamente marcadas pela digoxigenina (3'-5' DIG).

Trata-se de um *kit* exclusivo de identificação cromogênica de miRNAs a partir de material incluído em parafina. Esse *kit* utiliza a tecnologia de sondas modificadas pelo *Locked Acid Nucleic* (LNA™) que aumenta a sensibilidade e especificidade das sondas de miRNAs.

O protocolo de execução da técnica foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante e está descrito de maneira simplificada abaixo.

Para esta etapa foram utilizados tecidos fixados em formaldeído tamponado DEPC 10% por no máximo 24h e incluídos em parafina (Paraplast®, Sigma). Por se tratar de uma técnica extremamente minuciosa, requer que toda

a água utilizada durante o procedimento seja do tipo livre de RNase e todo o material utilizado seja previamente autoclavado.

Foram utilizados cortes de 6µm de espessura que, em seguida, foram desparafinizados em xilol e reidratados em etanol nas gradações 100%, 96% e 70%. Em seguida, os cortes foram incubados com solução de proteinase K na concentração de 15 µg/mL a 37°C por 10 minutos para permitir a penetração das sondas no tecido.

Nos passos seguintes, os cortes foram cobertos com mix de hibridização, utilizando sondas duplamente marcadas (3'-5' DIG), incubadas por 60 minutos a 55°C em banho-maria, seguido de imersão em solução SSC para retirada de excesso de reagentes das lâminas. Os cortes foram, então, cobertos com solução de anticorpos anti-DIG conjugados à fosfatase alcalina por 60 minutos a temperatura ambiente.

No passo seguinte, foram adicionados os reagentes 4-nitro-azul-tetrazolium (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato (BCIP) na proporção 1:3 durante um período médio de 48h. Esses reagentes permitem a visualização da marcação dos miRNAs ao microscópio óptico por converter a fosfatase alcalina a um substrato arroxeadado insolúvel (Figura 8). Finalmente, as lâminas foram contracoradas com *Nuclear Fast Red*[®] de modo a favorecer a observação da morfologia tecidual.

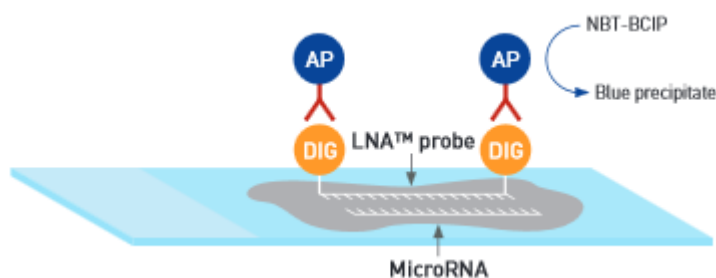


FIGURA 8. Representação esquemática da técnica cromogênica de *HIS EXIQON*[®] para identificação de miRNAs.

4.4.5 Com a finalidade de avaliar a expressão *in vitro* do miRNA sob a influência dos periodontopatógenos, foram utilizados os seguintes materiais e métodos.

4.4.5.1 Coleta de Sangue e Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

A coleta de sangue de 8 indivíduos saudáveis foi realizada através de punção venosa em tubos *vacutainer* de 10 mL contendo heparina. A separação das CMSP foi feita por centrifugação usando gradiente de Ficoll-Hypaque®. As amostras de sangue foram inicialmente diluídas em PBS na proporção 1:1, para melhor recuperação das células. O sangue diluído foi cuidadosamente colocado sobre a solução de Ficoll-Hypaque (1:2) (Pharmacia) e os tubos foram centrifugados à temperatura ambiente (20°C) por 40 minutos a 1200 rpm. O anel esbranquiçado, onde se encontram as células mononucleares, foi removido com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Estas células foram, em seguida, lavadas com tampão salina fosfato pH7.2 (PBS) em 3 centrifugações de 1200 rpm, 4°C por 10 minutos cada. Feito isso, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS. Uma pequena alíquota desta suspensão celular foi diluída em corante Azul de Tripán, na proporção 1:20, para contagem em câmara hemocitométrica e ajuste de volume, conforme previamente realizado por MOREIRA *et al.*, (2007).

4.4.5.2 Padronização do estudo *in vitro*

A padronização do experimento *in vitro* foi realizada baseando-se no estudo de HONDA *et al.* (2012), uma vez que ainda não se tem descrito as condições ideais para avaliação do miRNA-148a em cultura de CMSP sob o estímulo de periodontopatógenos.

Nessa padronização foram utilizadas amostras de CMSP de 3 indivíduos saudáveis na concentração de 1×10^6 células/1000 μ L de meio RPMI suplementado (1% de L- glutamina, 5% de soro humano inativado), cultivadas a 37°C em ambiente com 5% CO₂, sob as diferentes condições de tempo (1h, 4h, 8h e 12h). Para cada condição de tempo avaliada, foram utilizadas diferentes concentrações do estímulo de LPS de *P.gingivalis* (500ng/ μ L, 100ng/ μ L e 10ng/ μ L). Ao final do cultivo das células, as mesmas foram centrifugadas a 1200 rpm, 4°C por 10 minutos para separar o sobrenadante do *pellet* celular que foi armazenado em *RNAHolder* (BioAgency) congelado a -80°C até a extração do RNA total. Em seguida, realizou-se a análise da expressão gênica do miRNA-148a através de qRT-PCR.

De acordo com a padronização, as condições escolhidas para o experimento de cultura de CMSP sob estímulos bacterianos foram 4h de cultura, utilizando 10ng/ μ L de LPS de *P.gingivalis*, além do LPS de *E. coli* e *A. actinomycetemcomitans*. Também foram utilizadas as bactérias *A. actinomycetemcomitans* e *P.gingivalis* atenuadas por calor na concentração de 1×10^8 UFC/mL que inicialmente não foram incluídas na análise de padronização, uma vez que já se tem descrita sua utilização em culturas de CMSP (KINANE *et al.*, 2012).

No intuito de confirmar se as CMSP estavam, de fato, sendo estimuladas nas condições escolhidas, foi realizada uma leitura do experimento pela técnica de citometria de fluxo (FACScan-Becton-Dickenson).

Para isso as CMSP foram submetidas aos procedimentos para marcação de moléculas de superfície (CD80, CD86, CD14, TLR2, TLR4) e intracitoplasmática (TNF- α), seguindo-se o protocolo realizado por DUTRA *et al.*, (2000).

Os anticorpos que foram utilizados estão listados no Quadro 1.

QUADRO 1- Anticorpos monoclonais fluorescentes utilizados para comprovação de ativação celular.

Anticorpo	Fluorocromo
Anti-CD14	APC
Anti-CD80	PECy7
Anti-CD86	AmCyan
Anti-TNF α	PE
Anti-TLR2	FITC
Anti-TLR4	PE

4.4.5.3 Cultivo dos Periodontopatógenos

Foi necessário o cultivo das cepas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) (ATCC29523) e *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) (ATCC33277) para serem utilizadas como agentes estimuladores da cultura de CMSP.

As colônias de *A. actinomycetemcomitans* foram cultivadas em ágar TSA suplementado com sangue 5% e extrato de levedura 5%; enquanto *P. gingivalis* em ágar Brucella suplementado com sangue 5%, extrato de levedura 5% e hemina/menadiona 0,1%. Ambas foram incubadas em jarras de anaerobiose contendo mistura gasosa de 90% de N₂ e 10% CO₂ a 37°C por 48h. Em seguida, foi realizada a confecção de esfregaço em lâmina para coloração de Gram a fim de confirmar a ausência de contaminação das colônias bacterianas.

As bactérias cultivadas foram, em seguida, submetidas ao procedimento de inibição de seu metabolismo através da técnica de aquecimento a 100°C por 30 minutos, conforme preconizado por JIA *et al.*, (2013) na concentração MOI 100:1, ou seja, o número de agente estimulador foi 100 vezes maior que o

número de células estimuladas, nesse caso correspondendo à concentração de 1×10^8 UFC/mL (KINANE *et al.*, 2012).

4.4.5.4 Estudo *in vitro* da expressão do miRNA-148a sob estímulos bacterianos

A cultura de CMSP foi realizada em tubos individuais e em triplicata, de modo que em cada tubo foram adicionados 1×10^6 CMSP e 1000 μ L de meio RPMI suplementado (1% de L- glutamina, 5% de soro humano inativado).

Para cada amostra foram realizadas 6 diferentes condições:

- ∅ Sem estímulo bacteriano
- ∅ LPS de *Escherichia coli* (*E. coli*) (Sigma®) na concentração de 10 ng/ μ L
- ∅ LPS de *A. actinomycetemcomitans* (LPS cedido pelo Professor Ozamu Fujise - Universidade Kyushu, Japão) na concentração de 10 ng/ μ L
- ∅ LPS *P.gingivalis* (InvivoGen®) na concentração de 10 ng/ μ L
- ∅ Bactéria *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29523) atenuada através de aquecimento a 100°C por 30 minutos na concentração de 1×10^8 UFC/mL.
- ∅ Bactéria *P.gingivalis* (ATCC 33277) na concentração de 1×10^8 UFC/mL também atenuada pela mesma técnica descrita acima.

Em seguida, as CMSP foram cultivadas a 37°C em ambiente com 5% CO₂, por um período 4 horas. Ao término desse período, as células foram centrifugadas a 1200 rpm, 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante separado do *pellet* de células. Este foi armazenado em RNAHolder (BioAgency) e congelado a -80°C até a extração do RNA total para posterior análise da expressão gênica do miRNA-148a pela técnica de qRT-PCR.

4.4.6 Análise estatística dos resultados

As análises estatísticas foram realizadas após tabulação dos dados, utilizando métodos não paramétricos de análise, Mann-Whitney, Wilcoxon, correlação de Spearman, através do programa BioEstat 4.0 software (Belém, Brasil). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Perfil de miRNAs na PC

Os resultados referentes aos objetivos descritos abaixo foram compilados em forma de artigo científico submetido à revista *Human Immunology* (ANEXO E)

- ⊗ Traçar o perfil de miRNAs relacionados ao processo inflamatório da PC, comparando indivíduos com e sem a doença.
- ⊗ Quantificar e caracterizar o infiltrado inflamatório em amostras de tecido gengival de indivíduos com e sem PC.
- ⊗ Identificar e correlacionar a expressão dos miRNAs mais expressos com parâmetros clínicos da doença.
- ⊗ Identificar, dentre os miRNAs mais expressos, aquele mais relevante para a patogênese da PC e avaliar a sua expressão.
- ⊗ Identificar os possíveis alvos dos miRNAs mais expressos na PC.

Os resultados da expressão dos miRNAs nas amostras de PC considerando a gravidade da doença estão detalhados na Tabela 2.

TABELA 2 - Variação da expressão gênica de miRNAs na PC considerando a gravidade da doença

Amostra	Periodontite Grave			Periodontite Moderada		
	PS=8mm	PS=10mm	PS=7mm	PS=5mm	PS=5mm	PS=5mm
miRNA	<i>Fold change</i>	<i>Fold change</i>	<i>Fold change</i>	<i>Fold change</i>	<i>Fold change</i>	<i>Fold change</i>
miRNA-148a-3p	3,21	5,15	2,88	2,22	3,09	2,01
miRNA-142- 3p	5,07	4,83	2,26	0,79	0,99	1,32
miRNA-29b	6,21	2,22	1,66	0,98	2,58	0,99
miRNA-138- 5p	3,87	3,30	1,76	0,35	3,17	0,86
miRNA-142- 5p	2,04	2,35	1,18	0,16	0,99	0,79
miRNA-150- 5p	5,49	2,08	1,67	1,10	0,91	1,07
miRNA-191- 5p	1,54	2,56	2,15	1,47	1,17	0,92
miRNA-223-3p	2,00	1,98	8,77	0,99	1,73	0,93

PS= profundidade de sondagem. *Fold Change* = variação da expressão gênica; corresponde ao número de vezes que o miRNA está aumentado nas amostras PC em relação às amostras CN. *Fold Change* > 1,5 foi considerado referência para aumento da expressão gênica do miRNA, conforme proposto por SONG et al. (2013).

5.2 Quantificação relativa do miRNA-148a pela técnica de RT-qPCR TaqMan®

O miRNA-148a foi o miRNA mais expresso em todas as amostras de PC inicialmente avaliadas e por isso foi escolhido como alvo principal do estudo. A avaliação da expressão gênica desse miRNA foi ampliada em número de amostras, sendo realizada em um total de 17 amostras do grupo PC e 17 amostras do grupo CN. As amostras de PC exibiram quantificação relativa (RQ) média de 17,24 e as amostras CN RQ média de 14,05. Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (Teste Mann-Whitney; $p= 0,4144$) (Gráfico 1).

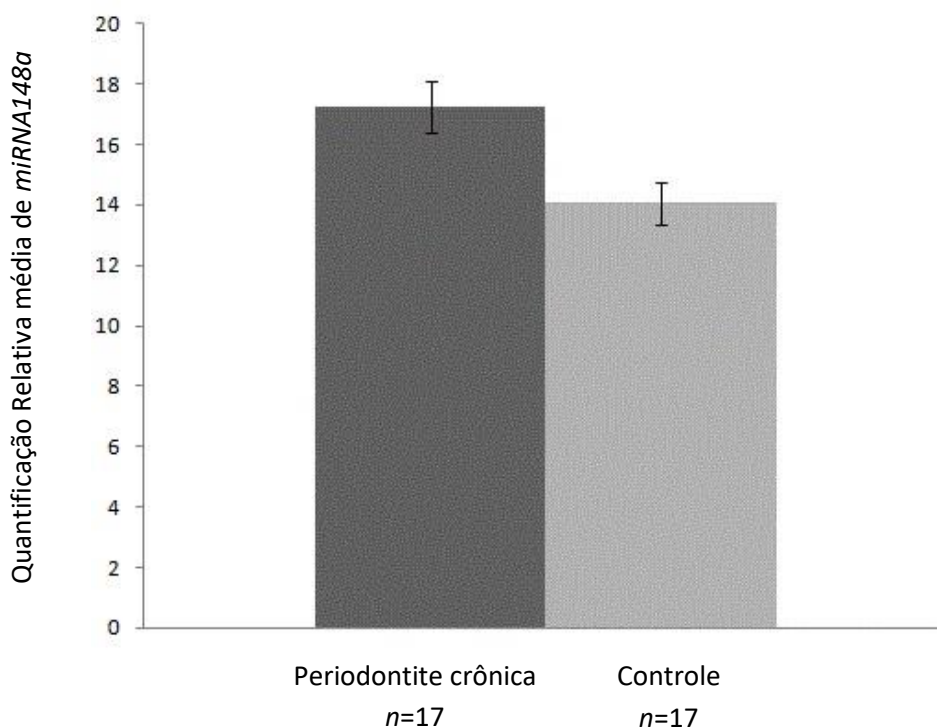


GRÁFICO 1. Quantificação relativa média (RQ) do miRNA-148a em periodontite crônica em relação a amostras controle por RT-qPCR, utilizando técnica de detecção TaqMan e endógeno RNU48. Pool de células sanguíneas de indivíduos saudáveis foi utilizado como calibrador da reação. (Teste Mann-Whitney; $p= 0,4144$)

5.3 Quantificação relativa do alvo do miRNA-148a (MafB)

Dentre os alvos do miRNA-148a, MafB foi escolhido para a avaliação no presente estudo devido a sua potencial relevância para o estudo na PC por estar relacionado a regulação da osteoclastogênese.

Foram realizadas análises de 17 amostras do grupo PC e 17 amostras do grupo CN. As amostras de PC exibiram quantificação relativa (RQ) média de 14,62 e as amostras controle RQ média de 17,82. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste Mann-Whitney; $p= 0,4183$) (Gráfico 2).

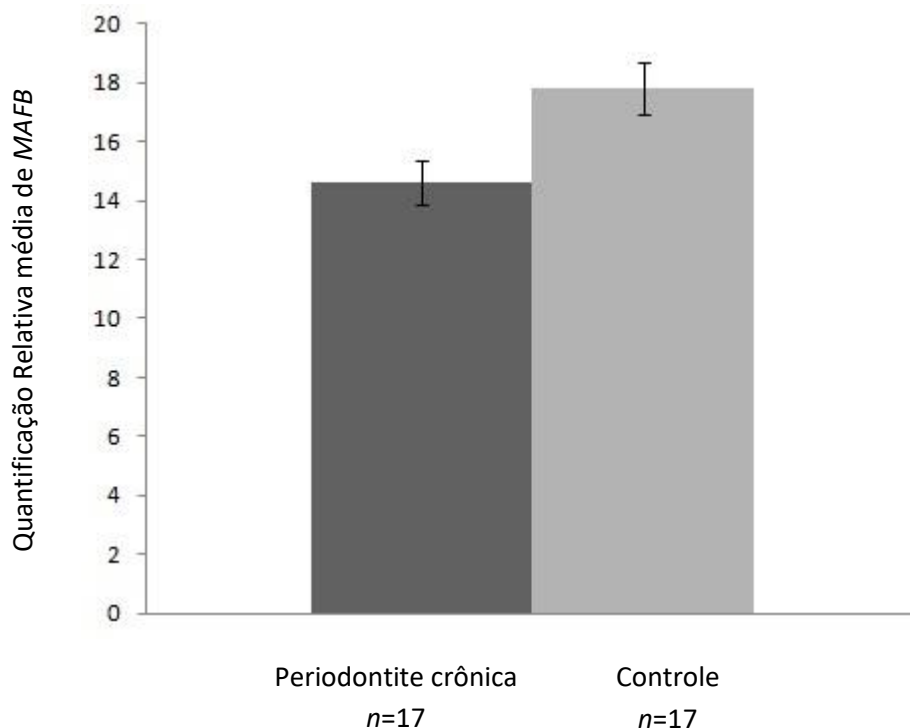


GRÁFICO 2. Quantificação relativa (RQ) média de MAFB em periodontite crônica em relação a amostras controle por RT-qPCR, utilizando técnica de detecção TaqMan e endógeno β -actina. *Pool* de células sanguíneas de indivíduos saudáveis foi utilizado como calibrador da reação. (Teste Mann-Whitney; $p= 0,4183$)

5.4 Híbridização *in situ* (HIS)

A Figura 9 mostra controle negativo, no qual não há marcação para as sondas miRNA-148a e U6, uma vez que não foi adicionado o anticorpo anti-DIG conjugados à fosfatase alcalina.

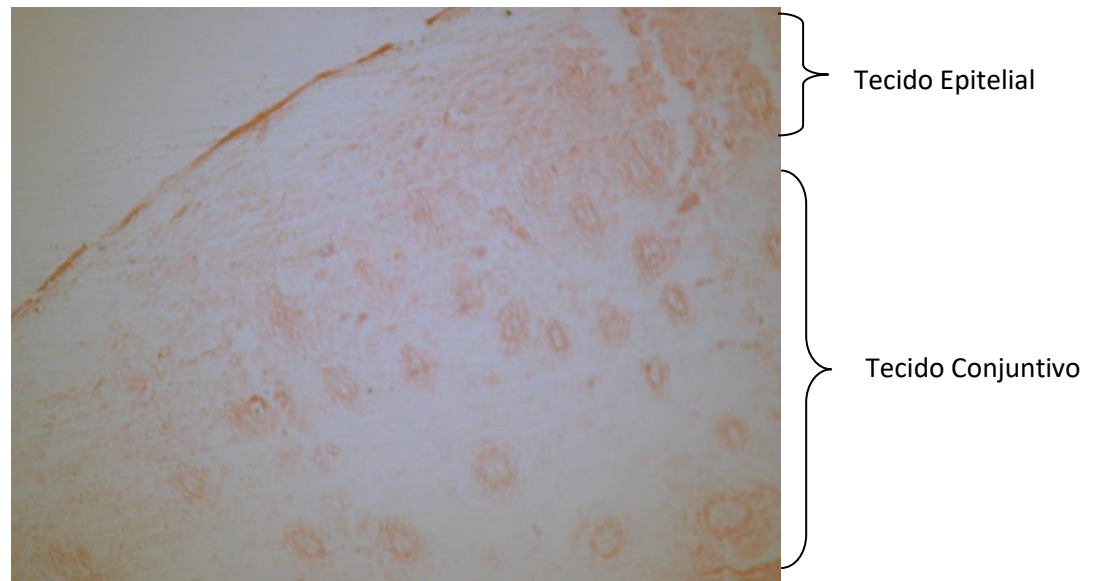


FIGURA 9. Controle negativo. Fragmento mucosa bucal revestida por de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado de indivíduo com PC (Aumento 200X).

A Figura 10 mostra marcação positiva para a sonda do endógeno U6, predominantemente, em células epiteliais de fragmento de gengiva de indivíduo com PC. A sonda U6 possui marcação específica nuclear, por se tratar de um snRNA, do inglês *non-coding small nuclear RNA*, ou seja, um RNA nuclear não codificante que faz parte de um complexo protéico nuclear que realiza *splices* gênicos.

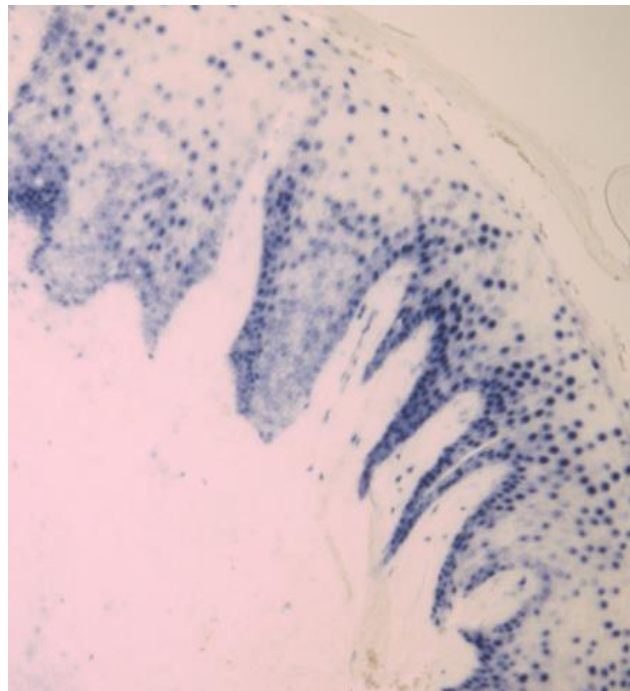
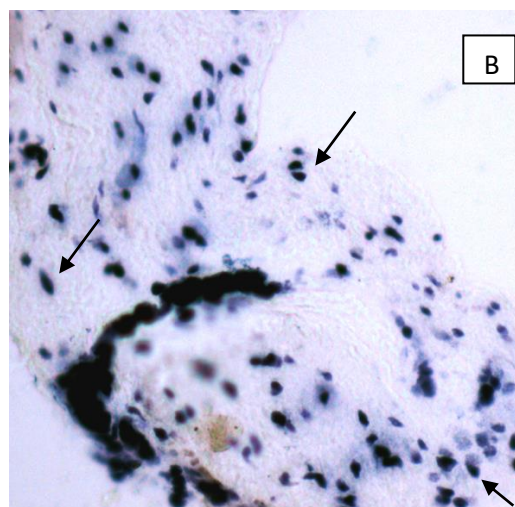
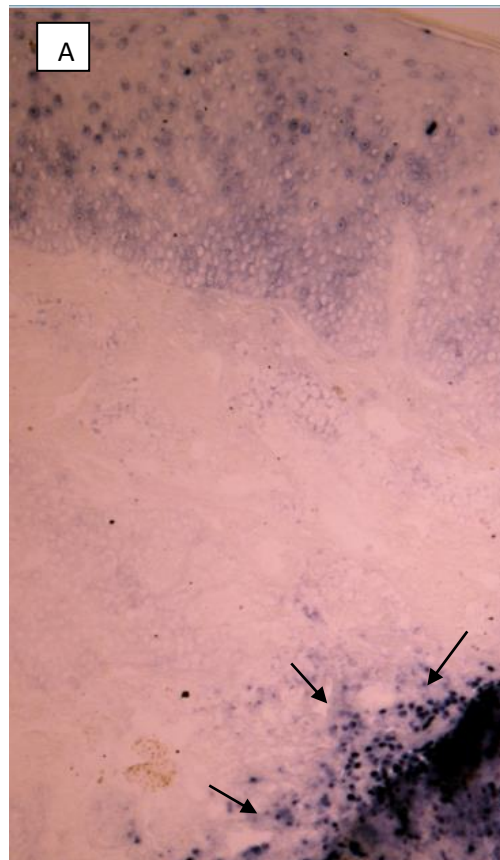


FIGURA 10. Marcação nuclear do endógeno U6 em fragmento mucosa bucal revestida por de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado de indivíduo com PC (Aumento 200X).

As Figuras 11A e B mostram marcação positiva da sonda do miRNA-148a, predominantemente, em células do tecido conjuntivo, tais como células fusiformes sugestivas de fibroblastos e células mais arredondadas sugestivas de células inflamatórias, em fragmento de gengiva de indivíduo com PC.



FIGURAS 11A e B. Marcação sonda miRNA-148a predominantemente em células do tecido conjuntivo de indivíduo com PC. Setas apontam para algumas áreas marcadas; células fusiformes e ovaladas (Aumentos de 200X e 400X, respectivamente).

5.5. Estudo *in vitro*

5.5.1 Padronização do estudo *in vitro*

Previamente à realização do estudo *in vitro*, foi realizada a padronização do experimento a fim de definir o melhor tempo de cultura celular, bem como a concentração do estímulo bacteriano. No experimento de padronização foi realizada a avaliação da expressão do miRNA-148a em amostras de CMSP de 3 indivíduos saudáveis em diferentes tempos de cultura: 1h, 4h, 8h e 12h; sob estímulo com LPS de *P. gingivalis* nas seguintes concentrações 500ng/μL, 100ng/μL e 10ng/μL. Os resultados obtidos estão representados no gráfico 3.

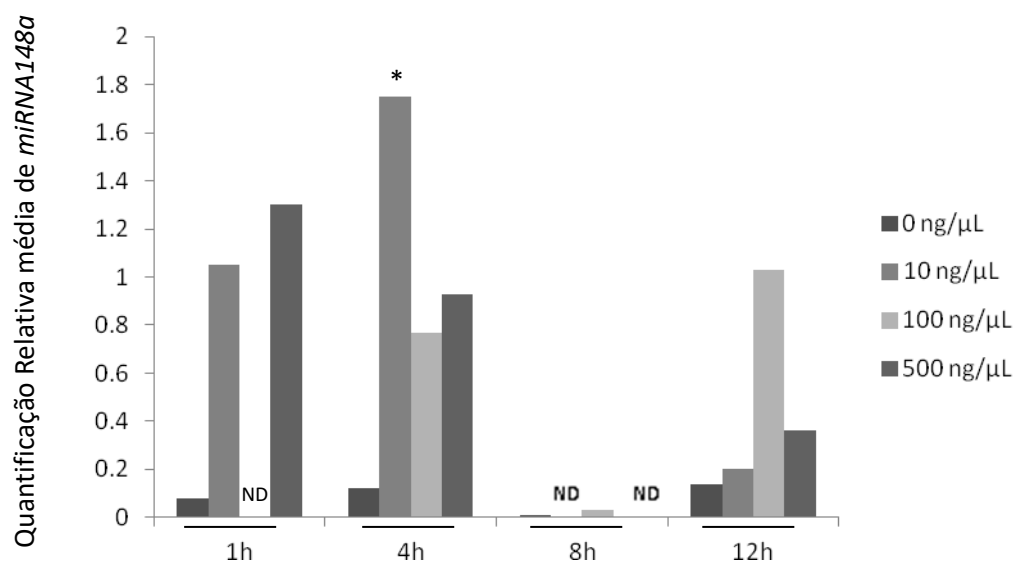


GRÁFICO 3. Quantificação relativa (RQ) média do miRNA-148a em amostras de CMSP de 3 indivíduos saudáveis realizada pela técnica de RT-qPCR. Cultura celular sem estímulo bacteriano foi utilizada como calibrador da reação. * O resultado da análise qualitativa dos dados revelou a condições de 4h com 10 ng/μL como sendo a de maior expressão gênica do miRNA148a. ND = não detectado.

Desta maneira, para a realização do experimento *in vitro* optou-se pela utilização das condições de cultura celular por 4h e com estímulo de 10ng/μL

do LPS bacteriano por terem sido as condições com tendência à maior expressão do miRNA-148a.

No intuito de confirmar se as CMSP estavam, de fato, sendo estimuladas nas condições escolhidas, foram realizados marcações para moléculas de superfície e intracitoplasmáticas através da técnica de citometria de fluxo (FACScan-Becton-Dickenson), utilizando os estímulos de 10ng/ μ L do LPS de *E. coli*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, além de estimulação com as bactérias *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, atenuadas pelo calor, na concentração de 1×10^8 UFC/mL. Foi observada, em uma análise descritiva, uma maior % de células CD14⁺, TNF α ⁺, maior IMF de CD80⁺, % células CD14⁺CD86⁺, % de células CD14⁺TLR4⁺ em todas as condições de estímulo bacteriano quando comparadas à condição sem estímulo.

5.5.1. Resultados da expressão do miRNA-148a do estudo *in vitro*

O experimento *in vitro* foi conduzido em amostras de CMSP de 8 indivíduos saudáveis com média de idade de 28,7 anos. Foram utilizadas as condições de 4h de cultura celular na presença e ausência dos estímulos bacterianos: LPS de *E. coli*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* na concentração de 10ng/ μ L e estimulação com as bactérias *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, atenuadas por calor, na concentração de 1×10^8 UFC/mL.

A RQ média foi definida para cada condição avaliada, tendo sido avaliado se houve aumento na expressão do miRNA-148a em relação ao grupo controle (sem estímulo) e entre os diferentes grupos de estímulos. A expressão do miRNA-148a foi significativamente aumentada nos grupos de estimulação com LPS de *A. actinomycetemcomitans* ($p=0,0357$) e de *P. gingivalis* ($p=0,0499$), em comparação ao grupo sem estímulo, conforme observado no gráfico 4.

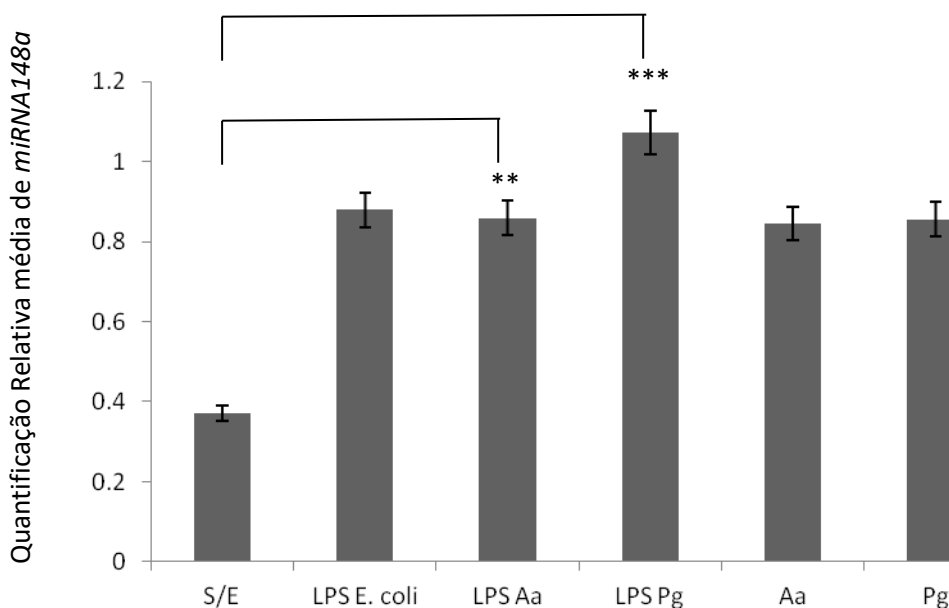


GRÁFICO 4. Quantificação relativa (RQ) média do miRNA-148a em amostras de CMSP indivíduos saudáveis (n=8) realizada pela técnica de RT-qPCR, normalizado por

RNU48. S/E: sem estímulo bacteriano; Aa: *A. actinomycetemcomitans*; Pg: *P. gingivalis*. Cultura celular sem estímulo bacteriano foi utilizada como calibrador da reação. Resultado estatisticamente significativo foi obtido ao avaliar o grupo S/E (referência) em relação ao grupo LPS *A.a*** ($p=0,0357$, Teste Wilcoxon) e também ao avaliar o grupo S/E em relação ao grupo LPS *P.g*** ($p=0,0499$, Teste Wilcoxon). Resultados não estatisticamente significativos: S/E em relação grupo LPS *E. coli* ($p=0.0687$, Teste Wilcoxon); S/E em relação grupo *Aa* ($p=0.1614$, Teste Wilcoxon); S/E em relação grupo *Pg* ($p=0.1614$, Teste Wilcoxon).

6. DISCUSSÃO

São escassos os estudos sobre o papel desempenhado pelos miRNAs na PC. Nosso estudo é o primeiro a avaliar a relação entre a presença dos miRNAs com os parâmetros clínicos da doença, tentando propor possíveis mecanismos de ação desses reguladores gênicos sobre o processo de início e estabelecimento da doença. Dentre os estudos que avaliaram a expressão de miRNAs nas amostras de PC em relação a amostras saudáveis, não foi observado um consenso para aos principais miRNAs alterados, possivelmente devido às diversificadas técnicas de avaliação da expressão gênica, bem como à utilização de grupos amostrais representativos da doença bastante distintos entre si (OGATA *et al.*, 2014; STOECKLIN-WASMER *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2011; XIE *et al.*, 2011). Contudo, nossos resultados estão de acordo com o encontrado por OGATA *et al.* (2014) em que também foi observado aumento na expressão dos miRNAs miR150 e miR-223. Tais evidências demonstram a necessidade de estudos adicionais que avaliem uma possível relação dos miRNAs miR150 e miR223 para a patogênese da doença.

Dentre os 84 miRNAs inicialmente avaliados em nosso estudo, os miRNAs: miR148a-3p; miR142-3p; miR-29b; miR138-5p; miR142-5p; miR150-5p; miR191-5p e miR-223-3p mostraram-se aumentados em cerca de 1,5 vezes nos doentes em relação ao grupo saudável, sendo esse aumento expressivo nas amostras com maior gravidade da doença. Esse resultado revela a importância da participação dos miRNAs no processo inflamatório da PC como reguladores epigenéticos da doença.

Foi observada forte correlação entre a expressão do miRNA-148a e a gravidade da doença, fato esse também verificado em relação ao miRNA142-3p. Possivelmente, esses miRNAs sejam os principais relacionados ao

processo inflamatório desencadeador de reabsorção óssea. Todavia, mais estudos são necessários para elucidar os reais mecanismos em que esses miRNAs estão atuando, inclusive tentando avaliar se ambos seriam bons marcadores biológicos de atividade e gravidade da doença.

O miRNA-148a por estar aumentado em cerca de 2 vezes em todas as amostras de PC inicialmente avaliadas foi selecionado como o miRNA alvo desse estudo. Ao aumentarmos o número de amostras tanto do grupo CN quanto PC para melhor avaliarmos a expressão do miRNA-148a observamos que a RQ média do grupo doente em relação ao controle manteve-se aumentada, entretanto tal resultado não foi estatisticamente significativo, como inicialmente observado. Algumas justificativas para esse achado podem estar relacionadas à seleção amostral, pois nas amostras de tecido gengival do grupo CN inicialmente avaliadas (n=4) praticamente não havia células inflamatórias em sua lâmina própria. O mesmo não ocorreu ao aumentarmos o número de amostras (n=17), devido à conveniência de seleção de amostras em que foram incluídas amostras CN que exibiam até no máximo um escasso infiltrado inflamatório na lâmina própria. É importante ressaltar que o diagnóstico de presença ou ausência de PC é definido clinicamente, sendo que tecidos gengivais clinicamente saudáveis, ou seja, que não exibem sinais clássicos de inflamação, comumente revelam, em uma análise histológica, um padrão de escasso infiltrado inflamatório em sua lâmina própria. Um estudo mais detalhado sobre a relação entre o miRNA-148a e o infiltrado inflamatório poderá ser realizada em experimentos *in vitro* cujas condições são melhor controladas.

Uma vez identificado na análise inicial o aumento da expressão do miRNA-148a na PC, foram realizadas buscas em miRBases e na literatura para

propor um possível alvo direto desse miRNA, que pudesse ter relação com a doença. Dessa maneira, foi identificada a molécula MafB que, por sua vez, representa um importante alvo de estudo na PC, pois está relacionada à regulação da osteoclastogênese em mecanismos ligados à RANKL (KIM *et al.*, 2007). Mesmo que a análise de expressão gênica de *MAFB* não tenha sido estatisticamente diferente entre os grupos, não está descartada sua relevância para a PC, pois embora os miRNAs sejam importantes reguladores gênicos, o processo de regulação mostra-se bastante complexo, sendo resultado de diversos eventos simultâneos que atuam de forma coordenada. Portanto, é difícil afirmar relação de causa efeito apenas pela análise de expressão gênica do alvo. Estudos *in vitro* que induzam inibição e superexpressão do miRNA-148a poderão esclarecer a relação deste miRNA com seu alvos. Também, outras moléculas importantes para a osteoclastogênese, tais como RANKL, *Mitf* e *c-fos*, devem ser avaliadas na tentativa de entender melhor os mecanismos envolvidos.

Os resultados da técnica de *HIS* nos remete a importância de tentarmos cada vez mais sermos específicos nos estudos dos miRNAs, por se tratarem de reguladores gênicos tecido específico. Os resultados obtidos nessas marcações foram imprescindíveis para identificarmos que a expressão do miRNA-148a está mais relacionada aos tipos celulares característicos do tecido conjuntivo, tais como os fibroblastos e células inflamatórias. Isso permitirá que estudos futuros avaliem mais especificamente a influência das alterações identificadas no tecido gengival em relação aos mecanismos de reabsorção óssea.

Devido a PC ser uma doença multifatorial cuja etiologia primária está relacionada a bactérias específicas, faz-se necessário o conhecimento da

influência desses microrganismos sobre a expressão dos miRNAs. Alguns estudos tem demonstrado íntima relação entre a presença bacteriana e o perfil de miRNAs (NAQVI *et al.*, 2013; NAHID *et al.*, 2011), contudo não existem relatos na literatura sobre a influência de estímulos periodontopatogênicos na expressão do miRNA-148a. Para isso realizamos experimento *in vitro* com CMSP na tentativa de avaliarmos se a presença de alguns periodontopatógenos modificaria o perfil de expressão do miRNA-148a. Observamos que a estimulação com LPS de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* contribuiu para aumento na expressão desse miRNA em cultura, quando comparado ao grupo sem estímulo. Enquanto a estimulação com LPS de *E. coli* e com as bactérias atenuadas não alteraram significativamente a expressão do mesmo. Tal evidência nos permite propor especulações acerca das vias de sinalização induzida por cada um desses estímulos bacterianos de modo que a ativação de diferentes vias de sinalização explicaria como cada um dos estímulos regularia, direta ou indiretamente, a ativação da transcrição do gene miRNA-148a.

Os estímulos de LPS ativam a cascata de sinalização da inflamação via *Toll-like receptors* (TLR), dos quais *A. actinomycetemcomitans* e *E. coli* atuam por TLR4; enquanto, *P. gingivalis* atua, preferencialmente, por TLR2, além de TLR4 e TLR7 (NAQVI *et al.*, 2013). Embora haja estimulação de TLR4 a partir dos três estímulos citados a própria diferença bioquímica e conformacional de cada molécula de LPS faz com que a estimulação de seus respectivos receptores seja distinta (NAQVI *et al.*, 2013), consequentemente, interferindo na indução da expressão do miRNA-148a. Outro fato relevante é que ambos TLR2 e TLR4, ao se ligarem aos seus respectivos agonistas, sofrem dimerização, havendo mudanças em suas conformações, necessárias para

recrutamento de um conjunto de moléculas intracitoplasmáticas adaptadoras que contém o domínio TIR, incluindo MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), TIRAP/MAL (*TIR-associated protein/ MyD88 adaptor-like*), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*). Entretanto, MyD88 e TRIF são responsáveis pela ativação de distintas vias de sinalização (TAKEDA *et al.*, 2003). Sendo assim, estudos funcionais específicos que avaliem as vias de atuação do miRNA-148a mostram-se necessários. Outra questão é o fato de que o estímulo através da bactéria atenuada não revelou aumento significativo do miRNA-148a, demonstrando ser necessário avaliar se a ativação desse miRNA está relacionada predominantemente aos estímulos por LPS de modo que outros fatores de virulência bacterianos talvez não sejam relevantes para indução do miRNA-148a. NAQVI *et al.* (2013) demonstraram, em culturas de células THP1, aumento na expressão dos miRNAs miR146a e miR29b sob estímulos com LPS de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* e também que alterações no meio podem alterar a estrutura molecular do LPS e, conseqüentemente, modificar a resposta de estimulação aos miRNAs. Esse talvez seja um dos grandes fatores limitantes para reprodução *in vitro* das condições encontradas na cavidade bucal. Entretanto, a avaliação *in vitro* da expressão do miRNA-148a a partir de CMSP de indivíduos portadores de PC, bem como um estudo do perfil bacteriano dos indivíduos poderá elucidar questões relacionadas ao sinergismo entre as interações bacterianas que existem nas bolsas periodontais, tornando-o um experimento que caracterize melhor a doença e a interação bactéria/miRNA.

A partir dos dados desse estudo é possível verificar que são inúmeras as perspectivas de estudos futuros para miRNAs e DP. Embora esses reguladores

gênicos tenham sido pouco avaliados na DP até o momento, novos estudos mostram-se necessários para elucidar a real participação desempenhada por esses reguladores gênicos. Esses estudos poderão ser úteis para o surgimento de propostas diagnósticas e terapêuticas alternativas para a PC através de tecnologias moleculares que controlem os eventos epigenéticos de atuação dos miRNAs.

7. CONCLUSÕES

Avanços recentes têm levado ao reconhecimento de que miRNAs possuem a capacidade de modificar muitas atividades celulares, incluindo o desenvolvimento e regulação da resposta imune e inflamatória. Os dados desse estudo evidenciam que a participação de miRNAs na regulação da etiopatogenia da DP é relevante.

Os miRNAs miRNA-148a-3p; miRNA-142-3p; miRNA-29b; miRNA-138-5p; miRNA-142-5p; miRNA-150-5p; miRNA-191-5p e miRNA-223-3p mostraram-se aumentados no grupo doente em relação ao saudável, sendo esse aumento expressivo nas amostras com maior gravidade da doença, portanto estudos adicionais são necessários para avaliar a relação desses miRNAs com a patogênese e gravidade da doença.

A avaliação funcional do miRNA-148a bem como seus alvos, tal como mafB, poderá definir os mecanismos em que esse miRNA esteja desencadeando e/ou alterando o curso da doença.

Outro ponto importante para ser esclarecido é a influência dos periodontopatógenos sobre a expressão dos miRNAs, uma vez que foi observado que estímulos específicos, LPS de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, foram capazes de induzir o aumento da expressão do miRNA-148a.

A partir desse estudo é possível levantar inúmeras as perspectivas de estudos futuros para miRNAs e DP que futuramente poderão servir de subsídio para novas abordagens para essa doença.

8. REFERÊNCIAS

1. AMBROS V, LEE RC, FEINBAUM RL. The *C elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75:843–54.
2. ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal disease and conditional. *Ann Periodontol*, Chicago, v. 4, n. 1, p.16, dec. 1999.
3. AMORMINO, SAF; ARÃO, TC; SARAIVA,AM; GOMEZ, RS; DUTRA, WO; da COSTA, JE; CORREIA-SILVA, JF; MOREIRA, PR. (2013) Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. *Human Immunology* 74(9):1231-1236. doi: 10.1016/j.humimm.2013.04.037.
4. BABEL, N.; CHEREPNEV, G.; BABEL, D.; TROPMANN, A.; HAMMER, M.; VOLK, H.D; REINKE, P. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factorbeta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, v.77, n.12, p. 1978-83, dec. 2006.
5. BANDRÉS E, CUBEDO E, AGIRRE X, MALUMBRES R, ZÁRATE R, RAMIREZ N, ABAJO A, NAVARRO A, MORENO I, MONZÓ M, GARCÍA-FONCILLAS J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer*. 2006; Jul 19;5:29.
6. BARTEL DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97.
7. BAYARSAIHAN DJ. Epigenetic mechanisms in inflammation. *Dent Res*. 2011 Jan;90(1):9-17. doi: 10.1177/0022034510378683.

8. BORRELL LN, PAPAPANOU PN. Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32:132–58.
9. BOBETSIS, Y.A.; BARROS, S.P.; LIN. D.M.; WEIDMAN,J.R.; DOLINOY, D.C; JIRTLE, R.L.; BOGGESS, K.A.; BECK, J.D; OFFENBACHER, S. Bacterial infectionpromotes DNA hipermethylation. *J Dent Res* , v.86, n. 2, p. 169-174, feb. 2007.
9. BRAGA RR, CARVALHO MA, BRUÑA-ROMERO O, TEIXEIRA RE, COSTA JE, MENDES EN, FARIAS LM, MAGALHÃES PP. Quantification of five putative periodontal pathogens in female patients with and without chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *Anaerobe*. 2010 Jun;16(3):234-9. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.02.007. Epub 2010 Mar 1.
10. CALIFANO, J.V. Position paper: periodontal disease of children and adolescents. *J Periodontol*, v.74, n.11, p. 1696-1704, nov. 2003.
11. CARTHEW RW, SONTHEIMER EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):642-55. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.035.
12. DE OLIVEIRA NF, ANDIA DC, PLANELLO AC, PASETTO S, MARQUES MR, NOCITI FH Jr, LINE SR, DE SOUZA AP. (2011) TLR2 and TLR4 gene promoter methylation status during chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 38(11):975-83. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01765.x
13. DUTRA WO, COLLEY DG, PINTO-DIAS JC, GAZZINELLI G, BRENER Z, PEREIRA ME, COFFMAN RL, CORREA-OLIVEIRA R, CARVALHO-PARRA JF. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+ B cells or activated T cells of

chagasic patients, respectively. *Scand J Immunol.* 2000 Jan;51(1):91-7.

14. ESKILDSEN, T; TAIPALEENMÄKI, H; STENVANG, J; ABDALLAH, BM; DITZEL, N; NOSSENT, AY; BAK, M; KAUPPINEN, S; KASSEM, M. (2011) MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 12; 108(15):6139-44. doi: 10.1073/pnas.1016758108.
15. FEINBERG AP, 2007. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447:433-440.
16. GARLET GP, MARTINS W Jr, FONSECA BA, FERREIRA BR, SILVA JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease.
17. GARTEL, A. L.; KANDEL, E. S. RNA interference in cancer. 2006; *Biomolecular Engineering.* 23, 17-32.
18. GARZON, R. MicroRNA expression and function in cancer. 2006; *Trends Mol. Med.* 1-8.
19. GREENE SB, HERSCHKOWITZ JI, ROSEN JM. Small players with big roles: microRNAs as targets to inhibit breast cancer progression. *Curr Drug Targets.* 2010 Sep;11(9):1059-73. Review.
20. GREGORY, R. I.; SHIEKHATTAR, R. MicroRNA Biogenesis and Cancer. 2005 *Cancer Res*; 65(9), 3509-12.
21. GRIFFITHS GS, WILTON JM, CURTIS MA. Permeability of the gingival tissues to IgM during an experimental gingivitis study in man. *Arch Oral Biol.* 1997 Feb;42(2):129-36.

22. HABER, D. A.; DIEDERICH, S. Sequence variations of microRNAs in human cancer: alterations in predicted secondary structure do not affect processing. 2006; *Cancer Res.* 66(12).
23. HARFE, B.D. MicroRNAs in vertebrate development. 2005; *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 410-415.
24. HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, v. 5, n.1, p. 78-111, jun. 1994.
25. HANEKLAUS, M; GERLIC, M; O'NEILL, LA; MASTERS, SL. (2013) miR-223: infection, inflammation and cancer. *Journal of Internal Medicine.* 274(3):215-26. doi: 10.1111/joim.12099.
26. HONDA T; TAKAHASHI N; MIYAUCHI S; YAMAZAKI K *Porphyromonas gingivalis* LPS induces miR-146a without altering the production of inflammatory cytokines (2012). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 420:918-925.
27. HUPPI, K. MicroRNAs and genomic instability. 2007; *Seminars in Cancer Biology.* 17, 65-73.
28. JIA R, T. KURITA-OCHIAI, S. OGUCHI AND M. YAMAMOTO Periodontal Pathogen Accelerates Lipid Peroxidation and Atherosclerosis DOI: 10.1177/0022034513475625 2013 92: 247 originally published online 25 January 2013
29. KINANE JA, BENAKANAKERE MR, ZHAO J, HOSUR KB, KINANE DF. *Porphyromonas gingivalis* influences actin degradation within epithelial cells during invasion and apoptosis. *Cell Microbiol.* 2012 Jul;14(7):1085-96. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01780.x. Epub 2012 Mar 28.

30. KINANE, D.F.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Interações entre parasita e hospedeiro na doença periodontal. In: LINDHE, Tratado de Periodontia Clínica e Implodontia Oral. 3 ed., Guanabara-Koogan, cap. 5, p. 148-175, 2005.
31. KINANE, D.F.; LINDHE, J. Patogênese da periodontite. In: LINDHE, Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. TO, ed., Guanabara- Koogan, cap. 5, p.127-152, 1999.
32. KIM, K; KIM, JH; LEE, J; JIN, HM; KOOK, H; KIM, KK; LEE, SY; KIM, N. (2007) MafB negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation. *Blood* 109(8):3253-2359.
33. KOBAYASHI, Y, UDAGAWA N, TAKAHASHI N. Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19:61–72.
34. LINDHE, J. Tratado de Periodontia Clínica e Implodontia Oral. 4 ed., Guanabara-Koogan, cap. 5, p. 148-175, 2005.
35. 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, nov. 1989.
36. LIU, Z; ZHOU, G; DENG, X; YU, Q; HU, Y; SUN, H; WANG, Z; CHEN, H; JIA, C; WANG, D. (2014) Analysis of miRNA expression profiling in human macrophages responding to Mycobacterium infection: Induction of the immune regulator miR-146a. *The Journal of Infection* 23. doi: 10.1016/j.jinf.2013.12.017.

37. LIVAK, KJ; SCHMITTGEN, T. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25(4):402–408.
38. LOA, K. et al. Real Time PCR profiling of 330 human micro-RNAs. *J. Biotechnol.* 2007; 2, 1-3.
39. LOPEZ, NJ; SMITH, PC; GUTIERREZ, J. (2002) Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: A randomized controlled trial. *Journal Periodontology* 73:911-924.
40. LU LF, LISTON A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology.* 2009; 127(3):291-8.
41. LU L.F., BOLDIN M.P., CHAUDHRY A., LIN L.L., TAGANOV K.D., HANADA T., YOSHIMURA A., BALTIMORE D., RUDENSKY A.Y., 2010. Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell.* 142(6):914-29.
42. MACK GS. MicroRNA gets down to business. *Nat Biotechnol.* Jun;25(6):631-8. 2007
43. MARTINS, P.H.F. Mecanismos patogênicos na doença periodontal: aspectos imunológicos. Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia da UFMG, 1997.
44. MOORE, W.E.C.; MOORE, L.V.H. The bacteria of periodontal disease. *Periodontol* 2000, v.5, p. 66-77, jun. 1994.
45. MOREIRA, P.R.; DE SÁ, A.R.; XAVIER, G.M.; COSTA, J.E.; GOMEZ, R.S.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in

a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res*, v. 40, n.4, p. 306-311, aug. 2005.

46. MOREIRA, P. R. ; LIMA, P. M. A. ; SATHLER, K. O. B. ; IMANISHI, S. A. W. ; COSTA, J. E. ; GOMEZ, R.S. ; GOLLOB, K. J. ; DUTRA, W. O. . Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals.. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 148, p. 119-126, 2007.
47. MOREIRA,P.R; GOMEZ, R.S.; DUTRA, W.O.. Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. *Inflamm. Res.*, 2009, 58(10):625-629.
48. OFFENBACHER, S. BARROS, S.P., BECK, J.D. Rethink Periodontal Inflammation. *J Periodontol*, 2008, 79(8):1577-1584.
49. OSADA, H., TAKAHASHI, T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2007; 28(1):2-12.
50. PAGE, 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.
51. PAGE, R.C.; SCHROEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation*. 1976, .34(3):p. 235-249.
52. PAULEY K.M.; SEUNGHEE C.; EDWARD K.L.C. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*. 32(2009) 189-194.
53. PLASTERK, R.H. Micro RNAs in animal development. *Cell*. 2006; 124, 877- 881.

54. RODRIGUEZ A., VIGORITO E., CLARE S., WARREN M.V., COUTTET P., SOOND D.R., VAN DONGEN S., GROCOCK R.J., DAS P.P., MISKA E.A. (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316: 608-611.
55. SANZ M.; WINKELHOFF J. A. Periodontal infections: understanding the complexity – Consensus of the Seventh European Workshop on Behalf of Working Group 1 of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Periodontology J Clin Periodontol* 2011; 38 (11): 3–6.
56. SAYED, D; ABDELLATIF M. (2011) MicroRNAs in development and disease. *Physiological Reviews* 91: 827–887.
57. SHARMA A, KUMAR M., AICH J., HARIHARAN M., BRAHMACHARI S. K., AGRAWAL A., GHOSH B. Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a *PNAS*, 2009, 106(14):5761–5766.
58. SLACK, F. J.; Esquela-Kerscher, A. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6: 259-269.
59. SOCRANSKY, S.S; HAFFAJEE, A.D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*, v.63, n.4, p.322-331, Apr 1992. Supplement.
60. SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD, CUGINI MA, SMITH C, KENT RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134-44.
61. STAEDEL C., DARFEUILLE F. MicroRNAs and bacterial infection. *Cellular Microbiology* (2013) 15(9), 1496–1507.
62. STOECKLIN-WASMER, C; GUARNIERI, P; CELENTI, R; DEMMER, RT; KEBSCHULL, M; PAPAPANOU, PN. (2012) MicroRNAs and their

- target genes in gingival tissues. *Journal of Dental Research* 91(10):934-940.
63. 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. (2011) Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality. *Blood* 9;117(23):6172-83. doi: 10.1182/blood-2010-12-325647.
64. TAGANOV KD, BOLDIN MP, CHANG KJ, BALTIMORE D. NF- κ B dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci* . 2006;103:12481–6.
65. TARGETSCAN HUMAN 6.0. URL:<http://www.targetscan.org> [accessed on 20 may 2014].
66. TANAHASHI Hiroshi, KITO Keiji, ITO Takashi, YOSHIOKA Katsuji. MafB protein stability is regulated by the JNK and ubiquitin-proteasome pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. DOI:10.1016/j.abb.2009.11.018
67. TAKASHIBA S, NARUISHI K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol*. 2006;2000(40):94–106
68. TAKAYANAGI H. The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Nov;1116:227-37.
69. TEILTELBAUM S.L. Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* 289:1504-8, 2000.
70. TERNOVEN, T.; RAUNIO, T.; KNUUTTILA, M.; KARTTUN, R. Polymorphisms in the CD-4 and IL-6 genes associated with

periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v. 34, n. 5, p. 377-383, may. 2007.

71. TREVILATTO, P.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M.; *et al.* Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol*, v.30, n.5, p. 438-442, May 2003.
72. XIE, YF; SHU, R; JIANG, SY; LIU, DL; ZHANG, XL. (2011) Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseases and healthy gingival tissues. *International Journal of Oral Science* 3(3):125-34. doi: 10.4248/IJOS11046.
73. YAMAZAKI, K.; NAKAJIMA, T.; AOYAGI, T.; HARA, K. Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in periodontal disease. *J Periodontol Res*, v. 28, n. 5, p. 324-334, sep. 2001.
74. WEISS G.J, BEMIS L.T, NAKAJIMA E, SUGITA M, BIRKS D.K, ROBINSON W.A, VARELLA-GARCIA M, BUNN P.A JR, HANEY J, HELFRICH B.A, KATO H, HIRSCH F.R, FRANKLIN W.A. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Ann Oncol*. 2008 Jun;19(6):1053-9. doi: 10.1093/annonc/mdn006. Epub 2008 Feb 27.
75. WU BH, XIONG XP, JIA J, ZHANG WF. MicroRNAs: New actors in the oral cancer scene 2011; *Oral Oncol*.47(5):314-9.
76. ZHANG HH, WANG XJ, LI GX, YANG E, YANG NM. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2007; 13, 2883-8

77. ZHOU, B; WANG, S; MAYR, C; BARTEL, DP; LODISH, HF. (2007)
miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks
early B cell development when expressed prematurely. Proceedings
of the National Academy of Sciences of the U S A 24;104(17):7080-5.

9. ANEXOS

Anexo A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 01311912.9.0000.5149

Interessado(a): Profa. Paula Rocha Moreira
Departamento de Morfologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 15 de outubro de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação de alterações epigenéticas da periodontite crônica**" bem como o Termc de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Errata



Prezado Centro Coordenador do CAAE 01311912.3.3001.5140,

Devido a um erro no sistema Plataforma Brasil, informamos que o número CAAE 01311912.9.0000.5149 do projeto 'Avaliação de Alterações Epigenéticas da Periodontite Crônica' foi gerado em um formato indevido. Após identificarmos o problema, foi programada a criação de um novo número CAAE 01311912.3.3001.5140 para o projeto, garantindo a permanência do histórico e de todos os dados do projeto. O procedimento de criação do novo número CAAE foi realizado em 05/04/2014. Desde já agradecemos a compreensão e pedimos desculpas pelo transtorno. Atenciosamente, Equipe Plataforma Brasil.

Anexo B

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

Assinatura do paciente

DOCUMENTADO APRESENTADO: _____

N.º: _____

Pesquisadora: **Telma Cristina Arão.**

Telefone: (31) 34093004

Assinatura Pesquisadora: _____

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

Telefone: (31) 34093004

Anexo C

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

Assinatura do paciente

DOCUMENTADO APRESENTADO: _____

N.º: _____

Pesquisadora: **Telma Cristina Arão.**

Telefone: (31) 34093004

Assinatura Pesquisadora: _____

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

Telefone: (31) 34093004

Anexo D

Raspado ()
 Fluido () Região: _____
 Tecido () Tipo: _____ Região: _____
 Outros () _____

Data: ____/____/____
 Código: _____
 PA() PC() C()

RCHA 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: _____ Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____

ANAMNESE

- Queixa principal: _____
- Início e evolução da doença, quando foi último tratamento: _____
- Está sob tratamento médico? _____
- Faz uso de algum medicamento? _____

- Fez uso de antibiótico e/ou antiinflamatórios nos últimos 6 meses? _____

- Tem algum tipo de alergia? _____
- 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: _____
- Existe na família alguma das alterações sistêmicas citadas? _____
 Qual o grau de parentesco? _____
- Habitos**
 - Fumante: () Fumou por quanto tempo: _____ Quantidade: _____ Tipo: _____
 - Ex-fumante: () Abandonou o hábito há quanto tempo? _____
 - Não Fumante ()
 - Quantas vezes ao dia escova os dentes? _____
 Sim Não
 () ()
 - Usa fio dental? () ()
 - Apresenta sangramento durante a escovação? () ()
 - Apresenta mobilidade nos dentes? () ()
 - Já perdeu algum dente devido à mobilidade? () ()

Observações: _____

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

Mobilidade
 0 fisiológica
 1 menor que 1mm no sentido V-L
 2 maior que 1mm V-L
 3 mobilidade intrusiva V-L / M-D

Perda de inserção
 1-2mm leve
 4 mm moderada
 > 5mm grave

Referencia Bibliografica: Periodontia clínica, Carranza; Newman, Takei, Klokkevold, Carranza; Elsevier Editora; 2007.

Anexo E

Artigo submetido ao periódico *Human Immunology*

Title: MicroRNAs profile related to immune response in chronic periodontitis: a preliminary study

Running title: microRNAs profile in periodontitis

Telma Cristina Arão^a; Simone Angélica de Faria Amormino^a; Luiz Paulo Carvalho Rocha^a; Walderez Ornelas Dutra^a; José Eustáquio da Costa^b; Paula Rocha Moreira^a.

^a Laboratory of Cell–Cell Interactions, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^b Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Correspondence address:

*Corresponding author: Paula Rocha Moreira

Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia, Laboratório de Biologia das Interações Celulares, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Phone: +55-31-3409-3003. E-mail address: paularocha@ufmg.br

Keywords: microRNA (miRNA); chronic periodontitis; immunology; epigenetics.

Conflict of Interest and Sources of Funding Statement

There are no conflicts of interest associated with this work.

Abstract

Periodontitis is an inflammatory disorder characterized by destruction of tooth supporting tissues. Epigenetic mechanisms have been related to periodontitis and may modulate the immune response influencing the gene expression. The objective of this study was to compare the expression of microRNAs (miRNAs) related to the immune response in gingival tissues from individuals without and with chronic periodontitis (CP). Also, we evaluated the association between the miRNAs expression and probing depth, as well as proposed the miRNA targets for future studies. The expression profile of 84 miRNAs was performed through miRNA PCR array. Expression level of most expressed miRNA was confirmed by RT-qPCR. The targets of the differentially expressed miRNAs were identified using database. Eight miRNAs (miRNA-148a-3p, miRNA-142-3p, miRNA-29b, miRNA-138-5p, miRNA142-5p, miRNA-150-5p, miRNA-191-5p and miRNA-223-3p) were significantly increased in the CP. The higher levels of upregulation were observed in miRNA-148a-3p, whose target includes a regulatory molecule of osteoclastogenesis. Positive correlation between probing depth and the number of miRNA upregulated were observed. Our data suggest that miRNA-148a-3p, miRNA-142-3p, miRNA-29b, miRNA-138-5p, miRNA142-5p, miRNA-150-5p, miRNA-191-5p and miRNA-223-3p might play an important role in CP. Functional studies are necessary to demonstrate a causal relationship between these miRNAs and their target in periodontitis.

Keywords: microRNA; chronic periodontitis; immunology; epigenetic.

1. Introduction

Chronic periodontitis (CP) is triggered by bacterial infection which leads to gingival inflammation that might cause the destruction of periodontal tissues and tooth loss. The complex interaction between periodontal pathogens and the host is a consequence of genetic and epigenetic mechanisms, which modulate the individual immune response by influencing the gene expression of important inflammatory mediators [1].

Many studies identified genetic events related to periodontitis susceptibility, such as cytokines gene polymorphisms [2-4]. More recently, epigenetic events have been matter of investigation, especially how the methylation may influence the development of periodontitis [5, 6]. However, little is known about the influence of other epigenetic events in the pathogenesis of periodontal diseases.

Nowadays, additional level of intricacy from epigenetic regulation has been introduced with the discovery of microRNA (miRNA). These are non-coding RNAs endogenously expressed that have approximately 22 nucleotides in length, classifying them as the shortest functional eukaryotic RNAs [7]. The miRNA function is executed mainly by downregulating messenger RNA (mRNAs) targets [8]. With respect to their mechanism of action, miRNAs silence gene expression by acting at the posttranscriptional level by imperfect binding to the 3' untranslated region (UTR) [9], which leads to translational repression or de-adenylation of their mRNAs target [7].

The miRNAs have been known to influence many cellular activities, including the development and regulation of immune response in important biological activities as well as in pathological conditions [10]. Several studies have investigated the role of miRNA in mechanisms of gene regulation related

to inflammatory diseases, as chronic obstructive pulmonary disease and rheumatoid arthritis [11,12].

Considering that miRNAs contribute to the pathogenesis of inflammatory diseases and that there are few reports about miRNA expression on periodontal diseases, this study aimed to compare the expression of 84 miRNAs related to immune response in samples of gingival tissues from individuals without and with CP. In addition, we evaluated the association between the miRNAs expression and severity of disease, as well as proposed the miRNA targets for future studies.

2. Materials and Methods

2.1. Subject population and sample collection

This study was approved by the ethical committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE – 01311912.3.3001.5140). All the patients and control subjects were examined at the Dentistry School of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil, according to ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki, and they gave their informed consent.

All subjects were submitted to anamnesis to clinical, periodontal, and radiographic examinations. The periodontal examination was performed by insertion of a periodontal probe in the gingival sulcus in all teeth obtained by a single examiner. All subjects were in good general health and had at least 20 teeth in the mouth. Exclusion criteria included any systemic disorder that would affect the periodontal condition, smoking, pregnancy or lactation, and patients who had used systemic antibiotics or anti-inflammatory medication in last 6

months. Except for the periodontitis, the patients included in this study were systemically healthy.

Diagnosis of CP was made considering the patient's medical and dental histories, radiographic findings and observations of clinical signs and parameters, including probing depth (PD), assessment of clinical attachment loss (CAL), tooth mobility and bleeding on probing. The parameters for CP classification were presence of ≥ 4 teeth with ≥ 1 sites containing PD ≥ 4 mm and CAL ≥ 3 mm [13,14]. CP exhibited amount of periodontal destruction consistent with the presence of local factors. The CP was comprised 6 individuals ($n=6$) whose samples was collected in gingival tissues during periodontal surgical therapy. The gingival fragments were obtained from sites with PD ≥ 5 mm, bleeding on probing and with radiographic bone loss. The control (C) ($n = 4$) was composed by gingival tissues from individuals with absence of signs of periodontal disease, as determined by the absence of CAL, no sites with PD >3 mm and absence of bleeding. The samples were obtained from surgery for non-disease-related reasons such as dental extraction for orthodontic treatment or crown-lengthening procedures.

The tissues collected were immediately placed in RNAholder (BioAgency Biotecnologia, São Paulo, Brazil) and stored at -80°C for posterior total RNA extraction. A second part of each sample was fixed with formalin 10% and parafin embedded.

The demographic and clinic parameters of groups are shown in Table 1.

2.2. Histological study

Sections of $6\ \mu\text{m}$ from parafin embedded samples were stained by haematoxylin–eosin for histopathological examination. The inflammatory

infiltrate in gingival tissue was measured using a microscope (Olympus®, BX51, America Inc.) at 400x magnification and interface to a computer. Cell counts were taken by a single examiner. The median of inflammatory infiltrate was determined by counting the number of inflammatory cells in the lamina propria in consecutive fields of all gingival samples, using the Image Tool software (version 3.0, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX).

Inclusion criteria for C group included the presence of scarce inflammatory infiltrate in the lamina propria. All samples from CP group displayed intense inflammatory infiltrate in the lamina propria.

2.3. RNA extraction

Total RNA was extracted using QIAzol®Lysis Reagent and miRNeasy Mini Kit (QIAGEN®), according to the manufacturer's protocol. The concentration of total RNA was determined by Nanodrop Spectrophotometer (ND-1.000) and the integrity of RNA was analyzed by electrophoresis on a 1,5% agarose gel, stained with ethidium bromide.

2.4. miRNA PCR array

Total RNA isolated from gingival tissues was analyzed by miRNA PCR array Human Immunopathology MIHS-104Z (SABiosciences, Qiagen®, Chatsworth, CA), according to the manufacturer's protocol. This array allows for the identification of 84 miRNAs differentially expressed in human immune response. This method is based in miRNAs to cDNA conversion followed by reaction with Quantitect SYBR® Green PCR Master Mix and miScript Universal primer (SABiosciences, Qiagen®, Chatsworth, CA). Aliquot of this mixture was applied across miRNA PCR array Human Immunopathology MIHS-104Z,

followed by running in CFX96 Real-Time PCR thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, USA). The conditions used were 15 min at 95°C, 15 sec at 94°C, 30 sec at 55°C and 30 sec at 70°C for 40 cycles. Data were analyzed using the Qiagen® data analysis software (SABiosciences, Qiagen®, Chatsworth, CA). The relative quantification of miRNAs was calculated with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [15].

2.5. RT- PCR (Transcriptional Reverse PCR)

The expression of miRNA most upregulated was confirmed by real-time PCR TaqMan®. The cDNA was synthesized from 10 ng of total RNA using gene-specific stem-loop primers to each miRNA (TaqMan® MicroRNA RT, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The conditions used were 30 min at 16°C, 30 min at 42°C, and 5 min at 85°C.

2.6. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Analysis of miRNA expression was performed using TaqMan® MicroRNA Assay and individual TaqMan® MicroRNA Assays (TaqMan® MicroRNA Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for miRNA-148a, in CFX 96 real-time PCR thermal cycler, at 95°C for 10 min, followed by 15 sec at 95°C, and 1 min at 60°C for 40 cycles. miRNA-148a expression was normalized to endogenous RNU48 (TaqMan® Micro RNA, Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as internal control. The experiment was done in duplicate. Relative quantification of these genes expression was calculated with the method of Livak & Schmittgen [15]. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy volunteers were used as a calibrator for the reactions and healthy gingival tissues was included as a control group or normalized group.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed using two-tailed Mann–Whitney-test and Spearman Correlation by SPSS 17.0 statistical software (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, EUA). Value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Histological evaluation

The median of inflammatory cells per field in the C group was 2, ranging from 1 to 2. In the CP group, the median was 175, ranging from 77 to 291. The Mann–Whitney test demonstrated significant difference among the groups ($p < 0.001$). The inflammatory infiltrate was mixed, but predominantly mononuclear in both groups. CP group demonstrated predominance of mononuclear infiltrate composed mainly by lymphocytes and plasma cells.

3.2. miRNA profile

As listed in Table 2, among 84 miRNAs analyzed, eight miRNAs were upregulated in CP as compared with C group ($p < 0.05$). The higher levels of upregulation were observed in miRNA-148a-3p. This increase was verified by at least 2-fold in all CP samples analyzed.

3.3. Real-time quantitative PCR (RT–qPCR) for miRNA-148a-3p

The relative quantification of miRNA148a-3p was higher in CP group than C group ($p = 0.0201$) (Figure 1).

3.4. Putative miRNA target gene prediction

Because the functions of most miRNAs are unknown, we used TargetScan Human 6.0 (www.targetscan.org) to identify potential targets of the upregulated miRNAs (Table 3).

3.5. Correlations with upregulated miRNAs

We performed correlation analysis between miRNA expression and clinical parameters measured at the site of sample removal. Positive correlation was observed between probing depth and number of miRNAs increased by at least 2-fold in CP group ($p = 0.016$, $r = 0.893$) (Figure 2A). Positive correlation between probing depth and fold change of miRNA-142-3p ($p=0.021$, $r=0.880$) (Figure 2B), and also with the miRNA148a-3p ($p=0.046$, $r=0.820$) in CP (Figure 2C) were observed. Correlation between other miRNAs upregulated and probing depth was not observed. Moreover, it was not observed correlation between number of inflammatory cells and upregulated miRNAs (data not shown).

4. Discussion

The comprehension of how epigenetic events may influence the triggering and progression of periodontitis is one of the major challenges for Periodontology. Our study aimed to identify the profile of miRNAs expression in CP samples compared to healthy gingival tissue, as well as predict the miRNA targets for future studies. Among 84 miRNAs evaluated, eight were increased significantly in CP: miRNA-150-5p, miRNA-223-3p, miRNA-138-5p, miRNA-29b, miRNA-191-5p, miRNA-142-3p, miRNA142-5p, miRNA-148a-3p and their functions can be related to the immune response in CP.

The miRNA-150 and miRNA-223 have been related to hematopoietic cells differentiation. The miRNA-150 has been found as one lymphopoietic-specific miRNA, and it is highly expressed in mature B and T cells [16, 17]. Thus, given that activated T and B cells are present in gingival tissue from CP, it is not a surprise that this miRNA is upregulated in CP samples. The miRNA-223 regulates the differentiation of myeloid precursors into granulocytes or monocytes [18]. Although granulocytes are not frequently found in CP gingival tissues, monocytes are often observed [19]. These miRNAs would be important targets of studies in an attempt to better understand the cellular profile in different stages of periodontal disease.

It has been described that miRNA-138 modulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cell (hMSCs) whereas its inhibition allows for the expression of osteoblast-specific genes, alkaline phosphatase (ALP) activity and matrix mineralization [20]. The miRNA-138 may represent a possible target for local pharmacological inhibition in an attempt to provide bone formation in periodontal diseases. Another miRNA related to osteoblastic differentiation is miRNA-29b. Suh *et al.* [21] showed that miRNA-

29b promotes differentiation of osteoblasts and controlling the expression of collagen in murine models. Collagen is one of the chief components of the extracellular matrix of gingival connective tissue; however the molecular mechanism of collagen loss in periodontitis requires further studies [22, 23].

The miRNA-191 acts on the cellular cycle as it affects the rate of cell turnover through action on cellular cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) [24]. This miRNA has been studied in mechanisms of tissue repair but exactly how these complex events occur is not yet known [25]. Thus, the role of miRNA-191 in healing process of periodontal tissues needs to be explored. Sun *et al.* [26] demonstrated that miRNA-142 is important in regulating IL-6 production by dendritic cells (DCs) after lipopolysaccharide (LPS) stimulation. Thus, this miRNA may be investigated during the immune response in CP.

Our data demonstrated that miRNA-148a-3p seems to be more relevant to the disease. There is strong evidence indicating that miRNA-148a may play important roles to allow osteoclastogenesis development [27]. Also, through bioinformatics predictions, it was identified that miRNA-148a target the molecule v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B, known as MafB [24]. Cheng *et al.* [27] validated that MafB proteins play a key role in modulating RANKL-mediated osteoclastogenesis, since that silencing of miRNA-148a inhibited bone resorption. These findings show that miRNA-148a could be a potential therapeutic target for osteoclastogenesis-block in CP.

Few studies evaluated miRNAs in periodontal diseases [28-30]. Perri *et al.* [28] reported the miRNA-30e and miRNA-106b upregulated in non-obese individuals with periodontal disease. These authors also verified a fold difference from 2.4 in expression of miRNA-142-3p in accordance with our study. Xie *et al.* [30] found ninety-one miRNAs upregulated in inflamed gingival

tissue, including the miRNA-142-3p and miRNA-29b. Stoecklin-Wasmer *et al.* [29] listed the top twenty-five miRNAs with increased expression in diseased gingiva, being the miRNA-451 and miRNA-223 the most overexpressed. Our dataset corroborates the reported overexpression of miRNA 148a and miRNA-223 in periodontal disease by these authors. Although previous studies have evaluated differential expression of miRNAs in gingival tissues, different approaches were adopted among studies, as sample selection, methods for miRNAs detection, profile of miRNAs investigated.

Our study shows evidence, for the first time, of miRNAs related to immune response in CP and associations with clinical parameters of disease. Positive correlation between PD and the number of miRNA upregulated were observed. We identified positive correlation between PD and the miRNA-148a-3p fold change, as well as with the miRNA-142-3p. Although these findings suggest that a greater number of miRNAs favors the disease severity, it is possible to assume that specific miRNAs could contribute to the development of disease severity.

A possible limitation from our study is related to small sample size. However, a high accuracy in selection of samples was applied, including the exclusion criteria described previously, as well as careful histological assessment of samples. While limited, our study shows results that indicate possible importance of miRNAs in CP and, thus, should be further investigated.

Our data provide potential candidates for further investigation of how miRNAs contribute to disease mechanisms. Functional studies are necessary to demonstrate a causal relationship between these small non-coding RNA and their target in periodontal diseases. The present investigation creates

perspectives to other studies about possible therapeutic treatment involving miRNAs related to host immune response in periodontal tissues.

5. Acknowledgements

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFMG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). PRM and WOD are CNPq fellows.

6. References

- 1- Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*, 2008; 79: 1560–8.
- 2- Mao M, Zeng XT, Ma T, He W, Zhang C, Zhou J. Interleukin-1 α -899 (+4845) C→T polymorphism increases the risk of chronic periodontitis: evidence from a meta-analysis of 23 case-control studies. *Gene*, 2013; 532(1):114-9. doi: 10.1016/j.gene.2013.09.043.
- 3- Zhong Q, Ding C, Wang M, Sun Y, Xu Y. Interleukin-10 gene polymorphisms and chronic/aggressive periodontitis susceptibility: a meta-analysis based on 14 case-control studies. *Cytokine*, 2012; 60(1):47-54. doi: 10.1016/j.cyto.2012.05.014.
- 4- Dutra WO, Moreira PR, Souza PE, Gollob KJ, Gomez RS. Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: lessons learned from oral diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009; 20(3):223-32. doi: 10.1016/j.cytogfr.
- 5- Amormino SAF, Araújo TC, Saraiva AM, Gomez RS, Dutra WO, da Costa JE et al. Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. *Hum Immunol*, 2013; 74(9):1231-6. doi: 10.1016/j.humimm.2013.04.037.
- 6- Viana MB, Cardoso FP, Diniz MG, Costa FO, da Costa JE, Gomez RS et al. Methylation pattern of IFN- γ and IL-10 genes in periodontal tissues. *Immunobiology*, 2011; 216(8):936-41. doi: 10.1016/j.imbio.2011.01.006
- 7- Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev*, 2011; 91: 827–87.

- 8- Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 2008; 455(7209):64-71. doi: 10.1038/nature07242.
- 9- Pauley KM, Cha S, Chan EKL. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun*, 2009; 32(3-4):189–94.
- 10- Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: Novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol*, 2008; 18(2):131–40.
- 11- Mizuno S, Bogaard HJ, Gomez-Arroyo J, Alhussaini A, Kraskauskas D, Cool CD et al. MicroRNA-199a-5p is associated with hypoxia-inducible factor-1 α expression in lungs from patients with COPD. *Chest*, 2012; 142(3):663-72.
- 12- Li X, Tian F, Wang F. Rheumatoid arthritis-associated microRNA-155 targets SOCS1 and upregulates TNF- α and IL-1 β in PBMCs. *Int J Mol Sci*, 2013; 14(12):23910-21. doi: 10.3390/ijms141223910
- 13- 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. *J Periodontol*, 2002; 73:911-24.
- 14- Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 2004; 34: 9-21.
- 15- Livak KJ, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 ^{$\Delta\Delta$} Ct method. *Methods*, 2001; 25(4):402–8.
- 16- Allantaz F, Cheng DT, Bergauer T, Ravindran P, Rossier MF, Ebeling M et al. Expression profiling of human immune cell subsets identifies miRNA-mRNA regulatory relationships correlated with cell type specific expression. *PLoS One*, 2012; 7(1):e29979. doi: 10.1371/journal.pone.0029979.

- 17- Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *P Natl Acad Sci U S A*, 2007; 104(17):7080-5.
- 18- Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LA, Masters SL. miR-223: infection, inflammation and cancer. *J Intern Med*, 2013;. 274(3):215-26. doi: 10.1111/joim.12099.
- 19- Younes R, Ghorra C, Khalife S, Igondjo-Tchen-Changotade S, Yousfi M, Willig C et al. Pertinent cell population to characterize periodontal disease. *Tissue and Cell*, 2009; 41(2):141-50. doi: 10.1016/j.tice.2008.09.003.
- 20- Eskildsen T, Taipaleenmäki H, Stenvang J, Abdallah BM, Ditzel N, Nossent AY, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011; 108(15):6139-44. doi: 10.1073/pnas.1016758108.
- 21- Suh JS, Lee JY, Choi YS, Chong PC, Park YJ. Peptide-mediated intracellular delivery of miRNA-29b for osteogenic stem cell differentiation. *Biomaterials*, 2013; 34(17):4347-59.
- 22- Buduneli N, Atilla G, Güner G, Oktay G. Biochemical analysis of total collagen content and collagen types I, III, IV, V and VI in gingiva of various periodontitis categories. *J Int Acad Periodontol*, 2001; 3(1):1-6.
- 23- Emingil G, Han B, Gürkan A, Berdeli A, Tervahartiala T, Salo T et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and tissue inhibitor of MMP-1 (TIMP-1) gene polymorphisms in generalized aggressive periodontitis: gingival crevicular fluid MMP-8 and TIMP-1 levels and outcome of periodontal therapy. *J Periodontol*, 2014; 85(8):1070-80. doi: 10.1902/jop.2013.130365
- 24- TargetScan Human 6.0. URL:<http://www.targetscan.org> [accessed on 7 may 2014].

- 25- Arodz T, Bonchev D, Diegelmann RF. A Network Approach to Wound Healing. *Adv Wound Care* (New Rochelle), 2013; 2(9):499-509.
- 26- Sun Y, Varambally S, Maher CA, Cao Q, Chockley P, Toubai T et al. Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality. *Blood*, 2011; 117(23):6172-83. doi: 10.1182/blood-2010-12-325647.
- 27- Cheng P, Chen C, He HB, Hu R, Zhou HD, Xie H et al. miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. *J Bone Miner Res*, 2013; 28(5):1180-90. doi: 10.1002/jbmr.1845.
- 28- Perri R, Nares S, Zhang S, Barros SP, Offenbacher S. MicroRNA modulation in obesity and periodontitis. *J Dent Res*, 2012; 91(1):33-8. doi: 10.1177/0022034511425045
- 29- Stoecklin-Wasmer C, Guarnieri P, Celenti R, Demmer RT, Kepschull M, Papapanou PN. MicroRNAs and their target genes in gingival tissues. *J Dent Res*, 2012; 91(10):934-40.
- 30- Xie YF, Shu R, Jiang SY, Liu DL, Zhang XL. Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseases and healthy gingival tissues. *Int J Oral Sci*, 2011; 3(3):125-34. doi: 10.4248/IJOS11046.

Figure 1. Relative quantification of miRNA-148a in chronic periodontitis ($n=6$) and control samples ($n=4$) ($p=0.0201$, Mann-Whitney test).

Figure 2. Correlation between miRNAs and probing depth in chronic periodontitis (CP). A) Positive correlation between probing depth and the number of miRNAs increased by at least 2-fold in CP ($p = 0.016$, $r = 0.893$); B) Positive correlation between miRNA-142-3p and probing depth in CP ($p=0.021$, $r=0.880$); C) Positive correlation between miRNA-148a and probing depth in CP ($p=0.046$, $r=0.820$).

Tables

Table 1. Demographic and clinical parameters of the study population.

	Control group (n=4)	Periodontitis group (n=6)
Age (years), mean \pm SD	31.3 \pm 11.3	43.5 \pm 9.7
Gender (n)		
Male	2 (50%)	3 (50%)
Female	2 (50%)	3 (50%)
Probing depth (mm), mean \pm SD	1.8 \pm 1.1	7.2 \pm 1.9
Clinical attachment loss (mm), mean \pm SD	2.1 \pm 0.4	7.5 \pm 2.2
Full-mouth bleeding score (%), mean \pm SD	6.3 \pm 5.4	49.7 \pm 12.8
Alveolar bone loss	no	yes

Table 2. Differential expression of miRNAs upregulated in gingival tissues from periodontal patients in relation to gingival tissues from healthy donors.

miRNA	Range of fold change
miRNA-148a-3p	2.01–5.15
miRNA-142- 3p	1.32 –5.07
miRNA-29b	1.00 –6.21
miRNA-138- 5p	1.76 –3.87
miRNA-142- 5p	1.18 –2.35
miRNA-150- 5p	1.07 –5.49
miRNA-191- 5p	1.17 –2.56
miRNA-223-3p	1.73 - 8.77

Table 3. miRNAs and some predicted targets TargetScan Human 6.0

Figures

Figure 1

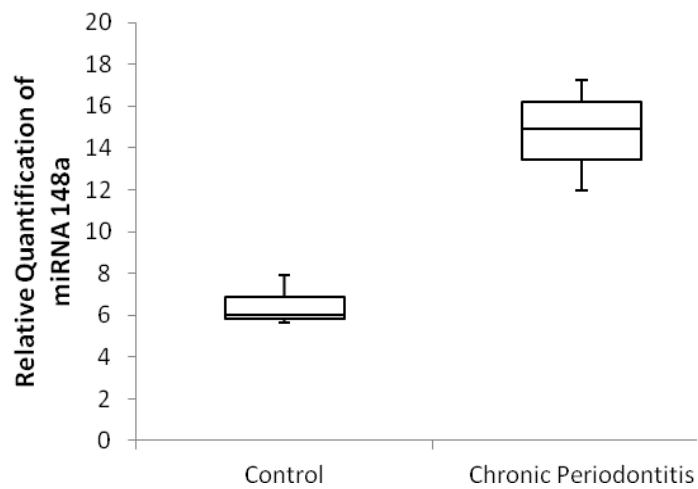


Figure 1. Relative quantification of miRNA-148a in chronic periodontitis ($n=6$) and control samples ($n=4$). Statistically significant result was observed, $p=0.0201$ (Mann-Whitney test). The miRNA148a levels were quantified by normalizing to endogenous RNU48 and relative to the calibrator (peripheral blood mononuclear cells).

Figure 2.

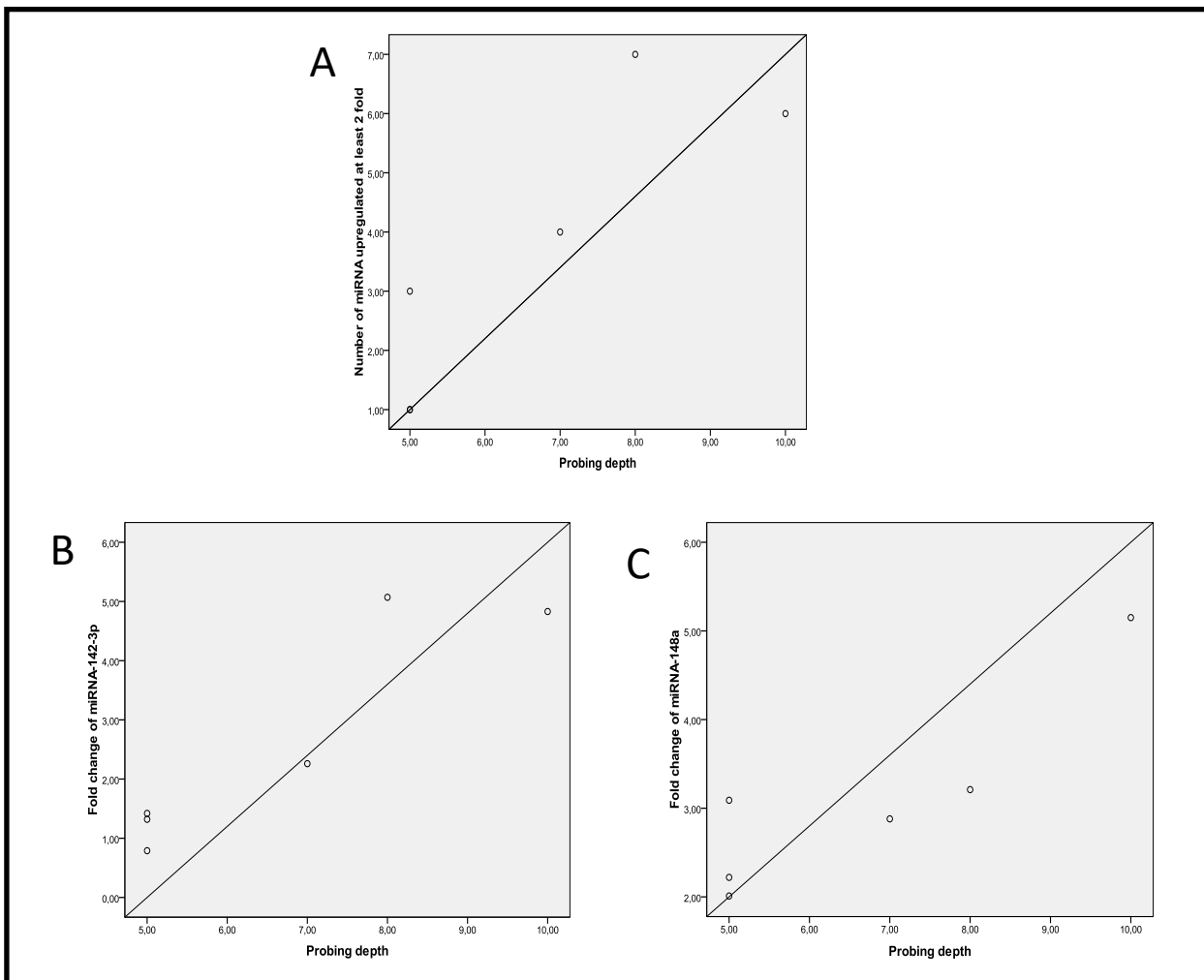


Figure 2. Correlation between miRNAs and probing depth in chronic periodontitis. A) With regards to clinical parameters in the site of sample removal, positive correlation was observed between probing depth in CP group relation to number of miRNAs increased by at least 2-fold ($p = 0.016$, $r = 0.893$); B) Positive correlation was observed between miRNA-142-3p and probing depth in CP group ($p=0.021$, $r=0.880$); C) positive correlation was identified between miRNA-148a and probing depth in CP group ($p=0.046$, $r=0.820$).

ANEXO F

Human Immunology 74 (2013) 1231–1236

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm

Hypermethylation and low transcription of *TLR2* gene in chronic periodontitis



Simone Angélica de Faria Amormino^a, Telma Cristina Arão^b, Adriana Machado Saraiva^b,
Ricardo Santiago Gomez^a, Walderez Ornelas Dutra^b, José Eustáquio da Costa^a,
Jeane de Fátima Correia Silva^a, Paula Rocha Moreira^{b,*}

^a Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^b Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

