

Fabiano Pereira Cardoso

IDENTIFICAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO NOS
GENES IFN- γ e IL-10 EM POLPA DENTAL HUMANA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

2009

Fabiano Pereira Cardoso

IDENTIFICAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO NOS
GENES IFN- γ e IL-10 EM POLPA DENTAL HUMANA

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação da
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial à obtenção de título de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Endodontia.

Orientador: Antônio Paulino R. Sobrinho

Co-orientadora: Paula Rocha Moreira

BELO HORIZONTE

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2009

Título:

Identificação do padrão de metilação nos genes IFN- γ e IL-10 em polpa dental humana. Belo Horizonte, Faculdade de Odontologia, UFMG, 2009. p81.

Tese: Mestrado em Odontologia (Área de concentração: Endodontia)

1. Metilação
2. Polpa dental
3. Inflamação
4. Interleucina -10
5. Interferon-gama

Universidade Federal de Minas Gerais – FO

Dedicatória

A minha MÃE e IRMÃ,

*Por mais que escreva, nunca demonstrarei a
totalidade do que sinto.*

Agradecimientos

*Citações e palavras são insignificantes, perto do que
fazem e significam pra mim.*

*Nunca me esquecerei, mesmo quando não mais
lembrar.*

Ao orientador Prof. Antonio Paulino

A co-orientadora Prof. Paula Rocha

Ao Prof. Ricardo Gomez

Ao Mestre Luiz Carlos Feitosa

A Prof. Maria Guiomar

A Erika Oliveira

A Erika Sales

A Isabella Peixoto

A Michelle Beatriz Viana

Ao Warley Tavares

A Ana Cecília

Aos Amigos do IES

Aos Amigos da Faculdade de Odontologia da UFMG

Aos Amigos do Laboratório de Biologia Molecular FO –UFMG

Sumário

Abstract	16
Resumo	18
1- Introdução	20
2- Revisão de Literatura	23
2.1 - Órgão Pulpar	24
2.2 - Resposta imune	25
2.3 - Citocinas	26
2.3.1 - Interleucina-10	28
2.3.2. - Interferon-gama	29
2.4 - Resposta imune-pulpar.....	31
2.5 - Epigenética	32
2.4.1 - Metilação do DNA	34
3 – Objetivos	37
4 - Matérias e métodos	39
4.1 - Caracterização da amostra	40
4.2 - Aspectos éticos	41
4.3 - Coleta e processamento do material para a análise	41
4.4 - Análise Histológica	42
4.5 - Extração do DNA	42
4.6 - Tratamento com bissulfito de sódio	43
4.7 - MSP (Reação em Cadeia de Polimerase Metilação Específica) para análise da metilação de IFN-gama	43
4.8 - Sequenciamento de DNA para avaliação da metilação do gene IL-10	44
4.9 - Análise dos resultados	46

5 – Resultados	47
5.1 - Análise Histológica	48
5.2 - Resultado do MSP para IFN- γ	49
5.3 - Análise do sequenciamento de DNA do gene IL-10	50
6 – Discussão	52
7 – Conclusão	57
7- Referencias bibliográficas	59
Anexo I	65
Anexo II	70
Anexo III	72

Lista de abreviaturas e Siglas

Lista de abreviaturas e Siglas

APC : células apresentadoras de antígenos

IFN- γ : interferon-gama

IL-10: interleucina-10

MSP : Reação em Cadeia de Polimerase Metilação Específica

PAMPs : padrão molecular associado à patógenos

PCR : reação em polimerase de cadeia

PRRs : receptores de reconhecimentos padrão

TLRs : Toll-like receptors

TNF : fator de necrose tumoral

Abstract

Identification of methylation pattern of IFN- γ and IL-10 genes in human dental pulp

Between the mechanisms with effectors and modulation action of immune response in pulp are the cytokines. Its regulation depends on several factors, among them; epigenetic factors are considered mechanisms of control of gene transcription. This mechanism allow activation or suppression of genes without modification in sequence of nucleotides of DNA. The methylation of DNA generates a conformational change that prevents the transcription. This has been evaluated in many tissues in the presence or absence of inflammation. The dental pulp, due to its characteristics, can provide constraints for the pattern of methylation. The purpose of the present study was to evaluate the methylation status of the genes in the cytokines IFN- γ and IL-10 in human dental pulp. For this two groups are selected: control (without inflammation) – pulps recovered for impacted tooth- and case (with inflammation) – pulps recovered from decayed tooth. The DNA was extracted, treated with sodium bisulfite, and the methylation was evaluated by MSP (IFN- γ) or sequenced (IL-10). Partial methylation was observed in case group and total methylation was observed in control group with respect IFN- γ gene. In relation IL-10, partial methylation and total methylation was observed in both groups. Concluded that epigenetic mechanisms can be involved in modulation of inflammatory response in pulp tissue.

Uniterms: Methylation; Dental pulp; Inflammation; Interleukine-10; Interferon-gamma

Resumo

Entre os mecanismos com ações efetoras e moduladoras da resposta imune pulpar encontram-se as citocinas. Sua regulação depende de diversos fatores, dentre eles, os fatores epigenéticos, considerados mecanismos de controle da transcrição gênica. Estes mecanismos permitem que genes sejam silenciados ou ativados, sem que haja alteração na seqüência de nucleotídeos do DNA. O processo de metilação do DNA gera uma alteração conformacional que impede a transcrição. O padrão de metilação dos genes tem sido avaliado em vários tecidos na presença ou ausência de inflamação. A polpa dental, devido a suas características, pode apresentar particularidades quanto a esse padrão. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ocorrência de metilação nos genes das citocinas IFN- γ e IL-10. Dois grupos foram selecionados: controle (sem inflamação) - polpas recuperadas de dentes inclusos – e, caso (inflamado) – polpas recuperadas de dentes cariados. O DNA foi extraído, tratado com bissulfito de sódio, e a metilação foi analisada por MSP (IFN- γ) ou seqüenciamento (IL-10). Observaram-se metilação parcial no grupo caso e metilação total no grupo controle ($p < 0,005$) no gene do IFN- γ . Quanto a IL-10, metilação parcial e total foram observadas em ambos os grupos. Concluiu-se que mecanismos epigenéticos podem estar relacionados à modulação da resposta inflamatória no tecido pulpar.

Introdução

1-Introdução

O complexo dentino-pulpar, constituído pelo órgão pulpar e paredes dentinárias circundantes, apresenta algumas particularidades, quando comparado a outros tecidos conjuntivos. Dentre estas, destaca-se o fato de se encontrar envolto por paredes rígidas, que limitam o estabelecimento do edema inflamatório. Outra característica relevante é o fato do órgão pulpar não apresentar uma circulação colateral, o que interfere nos mecanismos de defesa que aí se processam. No que diz respeito aos aspectos histofisiológicos, observa-se que este tecido apresenta uma camada de células especializadas periféricas, uma grande inervação sensitiva e uma abundante microcirculação (Yu & Abbott, 2007).

Quando submetido a danos físicos, químicos ou mecânicos, o complexo dentino-pulpar responde a estas agressões, a princípio, produzindo dentina reacional e esclerose dentinária e, mais tardiamente, reações vasculares imuno-inflamatórias são observadas. A resposta imune é ativada frente a uma agressão, podendo também ocorrer, ocasionalmente, como o resultado de uma auto-agressão (Trowbridge & Emling, 1996). O objetivo deste fenômeno é eliminar o agente agressor, permitindo que o reparo tecidual ocorra. Desenvolve-se de forma dinâmica, podendo variar em intensidade e duração. Essas variações decorrem não só em função do tipo e intensidade do agente agressor, mas também em função de características próprias do indivíduo (Pereira & Bogliolo, 1998).

As citocinas, peptídeos produzidas por diferentes tipos celulares, são agentes efetores e reguladores das respostas imuno-inflamatórias que ocorrem no tecido agredido, com suas ações ocorrendo sobre diversos tipos celulares (pleomorfismo).

Dentre os diversos mecanismos envolvidos na regulação da produção de citocinas estão os fatores epigenéticos, que podem controlar a transcrição gênica (Santos *et al.*, 2005).

Os fatores epigenéticos permitem que genes sejam silenciados ou ativados, sem que haja alteração na sequência de nucleotídeos do DNA. Dentre eles, destaca-se, o processo de metilação de DNA, que consiste na adição de um grupo metil à região promotora do gene, gerando uma alteração que pode impedir a transcrição gênica (Bird, 2002; Fitzpatrick & Wilson, 2003). Acredita-se que o padrão de metilação em genes de citocinas, possa estar relacionado com a transcrição ou não desses peptídeos, o que interferirá no padrão de resposta imune dos indivíduos frente a um dado estímulo. Embora alguns trabalhos tenham avaliado a ocorrência de metilação em diferentes tecidos, até o presente momento não existem relatos avaliando este fenômeno em polpa dental.

Sabendo-se que as características anatômicas do complexo dentino-pulpar interferem nas respostas imuno-inflamatórias que aí se processam, pode-se especular que o padrão de metilação do DNA pode ser influenciado por esse fator, o que interferiria na expressão de determinadas moléculas. Além disso, a polpa dental representa um excelente modelo de estudo para avaliar a interação entre inflamação e metilação do DNA, por minimizar a influência de fatores externos. Diante disto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o padrão de metilação dos genes responsáveis pela transcrição das citocinas IFN- γ e IL-10, ambas envolvidas na resposta imuno-inflamatória pulpar.

Revisão de Literatura

2-Revisão de Literatura

2.1-Órgão Pulpar

As células da polpa dental derivam da crista neural, sendo, portanto, um tecido de origem ectomesenquimal. Caracteriza-se por apresentar uma camada periférica de células especializadas, os odontoblastos. Além de densa inervação e rica microcirculação (Yu & Abbott, 2007).

O tecido pulpar saudável apresenta dentre outras células, aquelas envolvidas na resposta imune, sendo os linfócitos T citotóxicos e auxiliares as principais. Possui também, células dendríticas e macrófagos, mas parece não apresentar linfócitos B (Yu & Abbott, 2007).

Os odontoblastos são células únicas, localizadas na periferia pulpar, responsáveis pela formação dentinária e pela defesa pulpar. Apresentam prolongamentos celulares, no interior dos túbulos dentinários, que muitas vezes alcançam a junção amelo-dentinária (Yu & Abbott, 2007). Além disso, estão envolvidos no controle do fluxo sanguíneo, e no desenvolvimento da inflamação pulpar. A enzima NADPH-diaforase, envolvida na produção de óxido nítrico, um potente vasodilatador, está presente nessas células (Law *et al.*, 1999; Kerezoudis *et al.*, 1993) .

O tecido pulpar possui função sensorial, sendo grande sua sensibilidade a estímulos térmicos. Entretanto, independente da natureza do estímulo, a polpa somente o interpretará como dor (Holland, 1994).

2.2-Resposta imune

O sistema imune é o responsável por proteger o organismo contra possíveis agressões, sendo constituído pela resposta inata e adaptativa, intimamente relacionadas, e que se influenciam mutuamente (King, 2005; Albiger *et al.*, 2007).

A resposta inata não é específica contra os patógenos que agridem o organismo, entretanto, reconhece distintos padrões moleculares compartilhados por diferentes grupos de agentes infecciosos, definidos como “padrão molecular associado à patógenos” (PAMPs) (Hahn & Liewehr, 2007; Tosi 2005; King, 2005). Essas moléculas são reconhecidas por receptores padrão (PRRs) que, quando ativados, permitem uma rápida mobilização de mecanismos capazes de eliminar os agentes agressores (King, 2005; Hahn, 2007).

Entre os componentes da resposta inata estão às barreiras físicas, formadas por superfícies epiteliais intactas, e o sistema complemento. Este possui a capacidade de lisar a membrana celular de bactérias, inativar vírus, melhorar a fagocitose por neutrófilos e agir como quimiotáticos (Beutler, 2004; Tosi, 2005; King, 2005). Neutrófilos, macrófagos e células *natural Killer* são as principais células relacionadas a essa resposta, exercendo uma variedade de funções e produzindo uma gama de mediadores (Beutler, 2004; King, 2005).

A resposta inata ocorre de maneira inespecífica, levando a liberação de diversos mediadores, citocinas e quimiocinas que irão exacerbar o processo inflamatório local, estimulando a migração de diferentes tipos celulares, com o objetivo de debelar o agente agressor (King, 2005). Por sua vez, em determinadas situações, a resposta inata é incapaz de eliminar o agente agressor, estimulando uma resposta adaptativa.

A resposta adaptativa é antígeno-específica, tendo com principais componentes os linfócitos T e B e seus produtos, que incluem quimiocinas inflamatórias, citocinas e anticorpos. A resposta adaptativa pode eliminar o agente agressor diretamente através de suas células e mediadores, bem como potencializar os mecanismos efetores da resposta inata (Cooper & Alder, 2006; Hahn & Liewehr, 2007).

A interligação entre ambas as respostas se dá através das células apresentadoras de antígenos (Lind *et al.*, 2004), em particular pelos macrófagos e células dendríticas, bem como por mediadores, como as citocinas (Beutler, 2004).

A resposta celular, mediada por muitas dessas citocinas, consiste em induzir mudanças na expressão gênica das células alvo, resultando na expressão de novas funções e, às vezes, na proliferação dessas células. Dessa forma, citocinas, em grande parte, modulam as fases efetoras da imunidade natural e específica (Abbas, 2002).

2.3 - Citocinas

Citocinas são peptídeos produzidos por uma variedade de células do sistema imune, assim como por células epiteliais e endoteliais, podendo apresentar ação sistêmica e/ou local (Basset *et al.*, 2003). Atuam sobre receptores específicos, não só nas células que as produzem, ação autócrina, como também em outros tipos celulares, ação parácrina, influenciando sua função (Wilson, 2008; Pereira, 1994). Podem atuar como hormônios endócrinos clássicos e são componentes de uma ampla e complexa rede de sinais, responsável pela modulação da resposta imuno-inflamatória. Seu efeito sobre as células alvos pode ser inibido ou ampliado por outras citocinas, hormônios, receptores antagonistas de citocinas ou receptores circulantes (Beutler, 2004).

Sua produção pode ser influenciada por bactérias e seus subprodutos, por outros tipos de agentes inflamatórios, assim como por outros mediadores inflamatórios. Sendo um evento breve e autolimitado, iniciando pela transcrição do gene envolvido, após a ativação celular (Wilson, 1998; Abbas, 2000, Siqueira Junior, 2000).

Podem influenciar a ativação e recrutamento de células do sistema imune (Licastro *et al.*, 2005). Quando a intensidade do estímulo que induz a produção de citocinas é alta, elas passam a ser produzidas em grande quantidade e são liberadas na circulação sanguínea, podendo gerar alterações sistêmicas (Licastro *et al.*, 2005).

Em algumas doenças a resposta do hospedeiro ao agente agressor causa mais dano do que a própria presença deste agente. Um exemplo deste fenômeno é observado na úlcera inflamatória que se forma no intestino em resposta a infecção pelo *Helicobacter pylori* (Nathan, 2002). Isto ocorre de forma semelhante nas doenças pulpares, onde as paredes rígidas de dentina envolvendo o órgão impedem a instalação do edema inflamatório, levando à necrose tecidual (Hahn & Liewer, 2007).

A interação entre bactérias e células do hospedeiro, invariavelmente, resulta na liberação de uma ou mais citocinas, sendo que o tipo de citocinas produzida depende da bactéria e célula do hospedeiro envolvida nessa interação (Wilson, 1998).

Algumas citocinas possuem ação pró-inflamatória, enquanto, outras apresentam função antiinflamatória. São exemplos de citocinas com ação pró-inflamatória: o Interferon-gama (IFN- γ), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-12 e IL-18. Entre as antiinflamatórias temos: IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β (Netea *et al.*, 2003; von der *et al.*, 1996; O'Garra 1998).

2.3.1. - Interleucina-10

A interleucina-10 é uma importante citocina regulatória que apresenta, de forma geral, uma ação imunossupressora. Foi, inicialmente, descrita como sendo produzida por linfócitos Th2, tendo como principal ação inibir a ativação e produção de citocinas por linfócitos Th1. Originalmente identificada por sua habilidade em antagonizar a imunidade celular (de Waal *et al.*, 1991). Entre as suas características, destaca-se a potente ação imunossupressora, inibindo a ativação de células mononucleares, prevenindo a produção de mediadores pró-inflamatórios (de Waal *et al.*, 1991; Fiorentino *et al.*, 1991); deprimindo a apresentação de antígenos (de Waal *et al.*, 1991) e a expressão de moléculas co-estimuladoras *in vitro* (Willems *et al.*, 1994), além de modular a produção de quimiocinas (Moore *et al.*, 2001). Alguns de seus efeitos biológicos devem-se à sua habilidade em inibir muitas das funções dos macrófagos ativadas, sendo sua influência sobre a produção de IL-1 e TNF crucial para sua ação antiinflamatória. É liberada como resultado do estímulo às células do sistema imune por células apresentadoras de antígenos (Lind *et al.*, 2004) e, adicionalmente, em presença de células lesadas (Langenkamp, *et al.*, 2000). Apresenta ação pleiotrópica, ou seja, age em diversos tipos celulares, sendo produzida por monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, e células dendríticas (Dong *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 1993; Mosmann, 1994).

Apesar de predominantemente antiinflamatória, estudos recentes atribuem a IL-10 uma ação dual, pró e anti-inflamatória. Nos estágios iniciais da inflamação apresentaria ação pró-inflamatória. Apenas em estágios posteriores, genes que regulam a resposta adaptativa são expressos e sua ação antiinflamatória é observada. Assim, nos estágios iniciais da inflamação, a IL-10 induz a ativação de células *Natural Killer* (NK)

e atua como quimiotático para monócitos e macrófagos. Por sua vez, em estágios posteriores, suprime as funções pró-inflamatórias e a maturação de APCs, assim como inibe a liberação de moléculas co-estimuladoras (Mocellin *et al.*, 2003).

As ações da IL-10, avaliadas em modelos *in vivo* de auto-imunidade, câncer e transplantes, parecem determinar diferentes respostas. Dependendo da concentração e local de sua atuação, a IL-10 pode atuar como um citocina imunossupressora e ou potencializando a resposta imuno-inflamatória (Moore, *et al.*, 2001).

Adicionalmente, a IL-10 aumenta o crescimento e diferenciação de células B, granulócitos, células dendríticas, mastócitos e células endoteliais (Mocellin *et al.*, 2003).

2.3.2-Interferon-gama

O interferon-gama (IFN- γ) é uma citocina, predominantemente produzida por células T e NK em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios e imunes (Billiau, 2001). É produzido por células Th1, estimuladas por IL-12, sendo a principal citocina secretada por estas células. Sua produção é fundamental para que a resposta imune contra patógenos seja eficiente (Frucht *et al.*, 2001). Receptores para essa citocina são expressos por praticamente todas as células do corpo, permitindo sua ação em muitos órgãos e tecidos (Billiau, 2001).

O combate a infecções intracelulares depende da imunidade mediada por células, sendo o IFN- γ um dos principais moduladores (Dorman & Holland, 2000). Sua potente ação antiviral é baseada principalmente na indução a expressão de genes protetores, responsáveis pela síntese de mediadores como a proteína cinase ativadora de

RNA duplafita, algumas GTPases, 2'-5'oligoadenylate synthetase e proteína MxA, que conferem resistência celular, inibem a replicação e a disseminação viral (Bogdan, 2000).

O IFN- γ interfere na modulação da resposta inflamatória, ativando macrófagos e células endoteliais, estimula a secreção de quimiocinas, citocinas com ação quimiotática e outros mediadores inflamatórios. Adicionalmente, aumenta a atividade de células apresentadoras de antígenos e a capacidade de reconhecimento de antígenos por linfócitos T (Billiau, 2001). Ativa a transcrição de genes que participam da atividade antiviral, apoptose, processamento de antígeno, expressão de MHC e o desenvolvimento de linfócitos Th1. Além disso, induz macrófagos a destruir e/ou restringir o crescimento de bactérias alvos (Dorman & Holland, 2000).

Os defeitos associados aos mecanismos de atuação do IFN- γ provocam um grande dano à resistência contra infecções causadas por vírus e algumas bactérias (Billiau, 2006). Portanto, o IFN- γ possui relevante função na modulação da resposta inflamatória.

2.4 - Resposta imune pulpar

Diferentes agentes podem induzir uma resposta imunoinflamatória no órgão pulpar, sendo a infecção bacteriana advinda de um processo carioso o principal agente. Por sua vez, a resposta inflamatória na polpa dental apresenta algumas particularidades em relação aos outros tecidos, não só em função de sua localização anatômica, mas também em relação às células aí presentes, aos mediadores produzidos e a suas características fisiológicas, tais como a saída de um fluxo contínuo de líquido, gerado a partir de uma maior pressão intra-pulpar em relação ao meio externo, e a presença dos odontoblastos (Adachi *et al.*, 2007). Apesar de não fazerem parte da resposta inata

clássica, esses fatores são fundamentais na resposta contra a agressão microbiana no tecido pulpar. Além disso, o plexo neural pulpar influencia a resposta inflamatória, seja diretamente pela liberação de neuropeptídeos que ativam células do sistema imune ou indiretamente pelo aumento da vasodilatação (Kim & Lim, 2002).

Na polpa dental humana, o principal indutor de resposta inflamatória, e conseqüente produção de citocinas, são a agressão microbiana e seus subprodutos (Bergenholtz *et al.*, 1982). Uma vez que a cárie dental se processa lentamente, antes mesmo das bactérias alcançarem diretamente a polpa, seus subprodutos já a estimularam, induzindo uma resposta inflamatória inicial. Assim quando as células bacterianas entram em contato com o tecido pulpar, a resposta imune já foi ativada e a produção de citocinas iniciada (Hahn & Liewehr, 2007).

Vários estudos têm demonstrado a expressão de diferentes citocinas no órgão pulpar inflamado. Avaliando a polarização da resposta pulpar em função da profundidade da lesão cariosa e porcentagem de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* encontrada nessas lesões, Hahn *et al.* (2000), confirmaram a presença de mensagem (mRNA) para as citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 no órgão pulpar. A concentração de mRNA variou em função da profundidade da cárie, sendo observado uma pequena quantidade de mRNA para o IFN- γ , no grupo controle (dentes impactados), sem estímulo microbiano. Zehnder *et al.*, (2003) estudando a produção de (mRNA) de citocinas em dentes inflamados e normais, não encontraram diferenças estatísticas quanto a produção de IL-1 α e IL-1 β entre os grupos experimentais. Por sua vez, foi demonstrado previamente que, a citocina inflamatória IL-1 β é produzida pelo tecido pulpar em resposta ao LPS bacteriano (Lu *et al.*, 2002a).

Uma vez que os antígenos bacterianos induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, entre elas IL-12, IL-1, TNF α e IFN γ , assim como citocinas anti-

inflamatórias, como IL-10 (Tosi, 2005; Basset, *et al.*, 2003). O esclarecimento quanto aos diferentes mecanismos envolvidos nesta resposta é de extrema importância nos estudos da patogênese das alterações pulpares, bem como na implementação de novas estratégias terapêuticas na clínica odontológica.

2.5 - Epigenética

Epigenoma é o resultado da interação entre o genoma e o ambiente, representado na estrutura da cromatina e no padrão de metilação do DNA (Levenson & Sweatt, 2005). Epigenética, por sua vez, representa mudanças na expressão gênica possíveis de serem herdadas na meiose e mitose, que não são codificadas pela seqüência de nucleotídeos do DNA (Adcock *et al.*, 2007). O padrão de expressão gênica celular pode ser alterado por diversos mecanismos envolvendo o DNA, RNA ou proteínas (Vercelli, 2004).

Os fatores epigenéticos é um dos fatores que permitem que células com o mesmo genoma, tenham fenótipos distintos. Refere-se às mudanças na expressão gênica que não decorrem de alterações na seqüência de nucleotídeos, e que podem ser transmitidas por hereditariedade (Bird, 2002). Enquanto, a informação genética é codificada pela seqüência de DNA, a informação epigenética pode ser codificada por diferenças no padrão de metilação, por proteínas que estão associadas ao DNA e suas modificações covalentes, e pela estrutura da cromatina (Santos *et al.*, 2005).

A regulação da expressão gênica por mecanismos epigenéticos é um processo dinâmico, sendo que o seu *status* pode ser mudado, regulando a transcrição gênica em conjunto com fatores de transcrição (Vercelli, 2004). Assim, a metilação do DNA, algumas formas metiladas de histonas e a condensação da cromatina estão associadas à

inacessibilidade ao DNA e sua conseqüente repressão ou silenciamento. Por sua vez, o DNA não metilado, formas acetiladas de histonas e cromatina aberta estão geralmente associados com a ativação ou expressão de determinado gene. Esses fatores afetam a transcrição gênica, provocando mudanças no fenótipo, sem as correspondentes alterações de genótipo (Cho *et al.*, 2004; Vercelli, 2004).

Apesar de ser potencialmente hereditário, diferentemente da informação codificada pelas seqüências de nucleotídeos, o código epigênico pode ser modificado, permitindo que alterações ocorram (Fitzpatrick & Wilson, 2003). Entretanto, o padrão de metilação é mantido entre 97 e 99,9% das meioses, mostrando que fatores epigênicos são quimicamente estáveis (Bird, 2002).

Cada tipo celular possui um padrão epigenético único, determinado nas fases iniciais do desenvolvimento quando células pluripotentes se diferenciam em tecidos específicos (Vercelli, 2004). Entretanto, esse padrão pode ser modificado, por pressões do ambiente, determinando o desenvolvimento de doenças.

Alterações epigênicas estão associadas a diversas doenças, como o lúpus eritematoso (Lu *et al.* 2002b; Richardson 2003), a artrite reumatóide (Backdahl *et al.*, 2009), a bronquite asmática (Kwon *et al.*, 2008), dentre outras. Em alguns tumores, como no câncer gástrico que está associado à hipermetilação do gene RunX3 (Kitajima *et al.*, 2008), no câncer de nasofaringe associado à hipermetilação da região promotora do gene TIG1 (Kwong *et al.*, 2005); câncer coloretal (Lind, *et al.*, 2004), dentre outros.

Recentemente, os estudos vêm investigando os eventos epigenéticos envolvidos em doenças com perfil inflamatório, tais como doenças crônicas associadas ao envelhecimento, onde de uma forma geral se observa um aumento na taxa de ilhas CpG metiladas (Sánchez-Pernaute, 2008).

2.5.1-Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma alteração epigenética que ocorre pela adição covalente de um grupo metil, no carbono 5' do anel de citosina, resultando em uma 5-metilcitosina (5-mC) (Bird 2002; Baylin 2005). Esse processo não afeta a sequência primária de bases do DNA, mas resulta em uma alteração conformacional do mesmo. Podendo interferir diretamente na transcrição gênica, impedindo a ligação de fatores de transcrição, ou indiretamente atraindo repressores da transcrição (Kass *et al.* 1997).

A metilação ocorre geralmente nas ilhas CpG, normalmente localizadas nas regiões promotoras do gene, que são regiões ricas em citosinas e guanina na mesma fita de DNA (CG ou CpG, onde *p* representa o grupo fosfato) (Baylin, 2005) . Quando uma alteração epigenética ocorre em áreas onde a transcrição do DNA se inicia, a expressão da proteína pode ser alterada. Geralmente, genes metilados são silenciados, enquanto que a região promotora de genes ativados está hipometilada (Richardson, 2003).

A metilação do DNA pode interferir na expressão gênica de pelo menos três formas: 1) afetando diretamente a adesão de ativadores ou repressores da transcrição; 2) inibindo a transcrição através de proteínas de adesão à citosina metilada, que se liga especificamente ao DNA metilado; 3) alterando a estrutura da cromatina, influenciando na acessibilidade ao gene (Armenante *et al.*, 1999).

A metilação que está associada à repressão ou silenciamento genético funciona através de mecanismos diretos e indiretos. Os diretos incluem a inibição da adesão de fatores de transcrição ao DNA, enquanto os fatores indiretos resultam na compactação da cromatina, gerando um locus menos acessível aos fatores de transcrição (Fitzpatrick & Wilson, 2003).

Em células somáticas de animais, a 5-metilcitosina representam 1% das bases de DNA e afetam de 60 a 90% dos CpG, dinucleotídeos no genoma (Santos *et al.*, 2005). Entretanto, para que o silenciamento epigenético ocorra são necessários fatores adicionais, como a condensação da cromatina e a metilação das proteínas do grupo das histonas.

Portanto, apesar de controlar a atividade gênica, a metilação é insuficiente para inibir a transcrição sozinha. A configuração local da cromatina contribui para determinar quais genes serão ou não expressos, sendo a acetilação das histonas importante na determinação da estrutura da cromatina e, portanto, da transcrição gênica. Em geral, histonas acetiladas permitem a transcrição (Baylin, 2005).

Existem evidências mostrando que algumas doenças humanas podem estar associadas a alterações no padrão de metilação (Jones, 2001). No câncer, o silenciamento epigenético através da metilação ocorre com mais frequência que mutações ou deleções, podendo provocar um silenciamento anormal no funcionamento de genes supressores de tumores (Baylin, 2005).

O lúpus eritematoso sistêmico parece estar relacionado à hipometilação de determinados genes em células T (Sekigawa *et al.*, 2006). Além disso, alterações no padrão de metilação de alguns genes, parecem estar relacionadas a doenças, como a asma e artrite (Richardson, 2003).

Embora existam alguns estudos sobre metilação e doenças com perfil inflamatório, estudos dos eventos epigenéticos em genes de citocinas são escassos na literatura. Dentre os genes já estudados, destaca-se o do IFN- γ , onde um aumento na transcrição foi correlacionado com a hipometilação da região promotora do gene (Kersh *et al.*, 2006). Por sua vez, a presença de hipermetilação inibiu a expressão do mRNA e da proteína em linfócitos (Fitzpatrick & Wilson, 2003).

Armenante *et al.* (1999) observaram que após o tratamento com um agente desmetilante (5-aza-2 deoxicetidina) ocorreu uma redução na metilação do DNA correlacionada com uma hipometilação do gene da IL-6 e também com um aumento no nível da sua expressão em células de carcinoma de pulmão.

Szalmas *et al.* (2008) observaram que o padrão de metilação da região promotora do gene da IL-10 é um dos principais fatores envolvidos na regulação da transcrição deste gene. Sendo que em células produtoras de IL-10 a porção proximal deste gene está hipometilada.

Wilson (2008) sugere que o estado de metilação da região promotora do gene de TNF é importante na determinação no nível de expressão dessa citosina, podendo explicar em parte as diferenças observadas na resposta inflamatória de diferentes indivíduos.

Nile *et al.* (2008) observaram uma hipometilação em uma ilha CpG da região promotora do gene da IL-6, ao se comparar indivíduos com artrite reumatóide com indivíduos saudáveis. Por sua vez, Bruniquel & Schwartz (2003) observaram a demetilação do gene da IL-2 anteriormente a síntese dessa citosina por células T.

Estes dados sugerem que o padrão de metilação de genes codificadores de citocinas pode interferir na sua produção e, conseqüentemente, interferir no perfil da resposta imuno-inflamatória. Desta forma, a avaliação da presença de metilação em genes de citocinas poderá esclarecer importantes aspectos relacionados à resposta imune nas doenças pulpareas.

Objetivos

3 - Objetivos

Avaliar a ocorrência de metilação do DNA em genes relacionados à transcrição de citocinas na polpa dental humana.

Objetivos específicos

Avaliar a presença da metilação nos genes *IL-10* e *IFN- γ* em tecido pulpar com e sem inflamação.

Matérias e Métodos

4 - Matérias e métodos

4.1- Caracterização da amostra

Selecionaram-se 2 grupos amostrais, obtidos nas clínicas de graduação e pós-graduação na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, apresentando as seguintes características:

Grupo controle (Dentes sem estímulo pulpar)

Neste grupo coletaram-se o tecido pulpar de terceiros molares, totalmente inclusos, indicados para exodontia. Foram incluídos neste estudo aqueles dentes que se encontravam totalmente intra-ósseos, ou aqueles cuja coroa apresentava completamente coberta por tecido gengival. Foram descartados os elementos dentais que sofreram fratura durante o procedimento cirúrgico de remoção.

Grupo caso (Dentes com estímulo pulpar)

Neste grupo coletaram-se o tecido pulpar de elementos dentais erupcionados cariados e /ou restaurados que haviam sido indicados para a exodontia ou tratamento endodôntico. Foram incluídos neste grupo aqueles dentes que responderam positivamente aos testes de vitalidade pulpar e não apresentaram exposição do tecido pulpar à cavidade oral.

4.2-Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG), parecer n°. ETIC 390/08 (Anexo II).

O paciente e/ou responsável foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e aqueles que voluntariamente se dispuseram a participar desta pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I).

4.3-Coleta e processamento do material para a análise

Amostras coletadas a partir de dentes indicados para a exodontia.

Após os procedimentos cirúrgicos, os dentes foram imersos em hipoclorito de sódio a 2,5% por 5 minutos para remoção do tecido aderido a sua superfície externa, seguido da imersão em soro fisiológico, por 5 minutos, para a neutralização do hipoclorito. Após esses procedimentos, os dentes foram friccionados com gaze úmida para remoção dos tecidos remanescentes.

Um sulco longitudinal foi realizado ao redor de todo o dente, sem atingir a cavidade pulpar, com disco diamantado montado em peça de mão. Um instrumento metálico estéril foi então introduzido no sulco induzindo-se a fratura . O tecido pulpar foi removido, armazenado em *Tissue-Tek* e congelado a -80°C.

Amostras coletadas durante o tratamento endodôntico

Após remoção do tecido cariado e a constatação clínica de que o tecido pulpar não foi exposto, os dentes foram submetidos a isolamento absoluto e à desinfecção por polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) a 5%, seguido por hipoclorito de sódio a 2,5%. A cavidade de acesso endodôntico foi então realizada e a polpa dental removida com colher de dentina estéril. O tecido pulpar foi removido, armazenado em *Tissue-Tek* e congelado a -80°C.

4.4 -Análise Histológica

Cortes histológicos de 5µm, das amostras congeladas foram confeccionados e corados com hematoxilina para avaliação histológica. Os cortes foram submetidos à contagem de células inflamatórias, com um aumento de 400x, e o número total de células inflamatórias obtido para cada amostra.

4.5-Extração do DNA

Extraíu-se o DNA presente no tecido pulpar utilizando-se o QIAamp DNA Tissue Mini Kit (Qiagen 51106), obedecendo-se as instruções do fabricante. O DNA obtido foi diluído em água, estocado a -20°C, e posteriormente utilizado para amplificação das regiões de interesse pela técnica de PCR (MSP) e através do seqüenciamento gênico.

4.6-Tratamento com Bissulfito de Sódio

O padrão de metilação foi avaliado através da técnica de PCR específica para metilação - (MSP). Essa técnica distingue os alelos metilados dos não-metilados de um gene, baseando-se na mudança induzida no DNA pelo tratamento com o bissulfito de sódio. Este tratamento converte as citosinas não metiladas em uracila, enquanto as citocinas metiladas são protegidas dessa conversão.

Fez-se a conversão por bissulfito de acordo com Goldenberg *et al.* (2004). Em resumo, 1µg de DNA foi desnaturado por incubação em 2 µl de NaOH 3M, por 20 minutos, a 50°C. Seguiu-se o tratamento com o bisulfito de sódio (2.5M) e a hidroquinona (1M), por 3 horas, a 70°C. As amostras, de DNA modificado foram purificadas pelo Wizard DNA Purification Resin, de acordo com as recomendações do fabricante (Promega, Madison, WI, USA), seguido pela eluição em água MilliQ. Posteriormente, adicionou-se NaOH (3M), para completa modificação e precipitação por etanol. Os *pellets* foram resuspendidos em 25 µl de TE e congelados a -20°C.

4.7 MSP (Reação em Cadeia de Polimerase Metilação Específica) para análise da metilação de IFN-gama

O DNA tratado pelo bissulfito de sódio foi amplificado utilizando-se os primers abaixo relacionados para se identificar os alelos metilados e não metilados, utilizando-se a técnica de MSP para avaliação do gene IFN-gama.

Os *primers* utilizados em cada reação foram: Não-Metilados F –
 5`GTGATAATGGGTTTGTTTTATT3` e R-
 5`CCTAATTAATAATCTCCTAAAAATTACATA3` e Metilados 5`F-

GTGGGTATAATGGGTTTGTTCATC3` e R- 5`AATTAAAATC
TCCTAAAATTACGTA3` (Bonilla-Henao *et al.* 2005).

A reação de PCR foi realizada apresentando em um volume final de 25µl, 10XPCR buffer, 5 µl dNTP-mix (1mM de cada), 0,75µl magnésio (50mM), 0,5µl de cada primer (20pmol/µl), 0,5µl de *Taq Platinum* DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies, Calsbad, CA, USA) e 200 ng de DNA. As condições de amplificação consistiram de 94⁰C por 4 min, seguidos de 30 ciclos de 94⁰C por 1 min, 48⁰C por 1 min e 72⁰C por 1 min, e uma extensão final de 7 min a 72⁰C. A reação foi realizada no termociclador Eppendorf AG, Germany. Foram utilizados como controle positivo da reação metilada, DNA tratado com a enzima SssI metilase (New England Biolabs, Ipswich, Mass, USA) e para a reação não metilada DNA de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) (Kowng *et al.*, 2005; Brakensiek *et al.* 2005).

Os produtos do MSP foram verificados pela eletroforese em gel de poliacrilamida. Foram aplicados 2ml de cada produto juntamente com 2ml de gel loading buffer (GLB) no gel a 6,5%. A corrida foi realizada em tampão TBE 1x, a 160V, durante aproximadamente 40 minutos, utilizando-se cuba específica (mini vertical gel electrophoresis unit, Sigma). Posteriormente, cada gel foi corado pela prata para verificação e análise do material amplificado. Como controle negativo, realizou-se a reação com ausência de DNA. Controles positivos e negativos foram utilizados em todos os experimentos.

4.8 - Sequenciamento de DNA para avaliação da metilação do gene IL-10

O DNA tratado com bissulfito foi amplificado pela técnica de PCR, utilizando-se os *primers* : F - 5`-GGTAGGGGTTATGGTGAGTATTATTTGA-3 e R -

5`CCTAAACTAACCCCTCCACCCAATC 3, previamente descritos (Szalmas, 2008). Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% e corado por prata. Para a reação de PCR foram incluídos 2,5µl de 10XPCR buffer, 5 µl dNTP-mix (1mM de cada), 0,75µl magnésio (50mM), 0,5µl de cada primer (20pmol/µl), 0,5µl de *Taq Platinum* DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies, Calsbad, CA, USA) e 200 ng de DNA, constituindo um volume final de 25µl. Neste caso as condições para amplificação consistiram de 94⁰C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94⁰C por 1 min, 60⁰C por 30s e 72⁰C por 1 min, e uma extensão final de 10 min a 72⁰C. A reação foi realizada no termociclador Eppendof AG, Germany. Os produtos foram analisados em gel de alcrilamida 6,5% corados pela prata, e em seguida purificados pelo GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), segundo instruções do fabricante.

Posteriormente, os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação de seqüenciamento. Cada reação para seqüenciamento consistiu de um volume final de 20µl, por adição de 2µl de Big DyeTM, 3µl de tampão, 1µl do primer diluído (1:5,25) e 400ng de produto de PCR, colocados no termociclador Eppendof AG, Germany. Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados de acordo e sequenciados no ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os CGs analisados no gene da IL-10 foram -634, -599, -373, -352, -350, -320, -185, -110.

Este último procedimento permitiu que se confirmasse a efetividade do tratamento por bissulfito ao demonstrar que as citosinas presentes fora das ilhas CpG eram lidas como timina, demonstrando a conversão.

4.9 - Análise dos resultados

Foi feita análise estatística usando o teste de Mann-Whitney pelo programa BioEstat 4.0 (Belém, Brasil). Um valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

Resultados

5 - Resultados

5.1 - Análise Histológica

Observaram-se ao se analisar os cortes histológicos que, no grupo controle a média do número de células foi de 10, variando de 2 a 75 células. No grupo caso a média foi de 61, variando de 23 a 180 células ($p=0.0025$).

Apenas duas amostras no grupo caso mostraram predominância de polimorfonucleares neutrófilos, enquanto nos demais cortes houve um predomínio de células mononucleares.

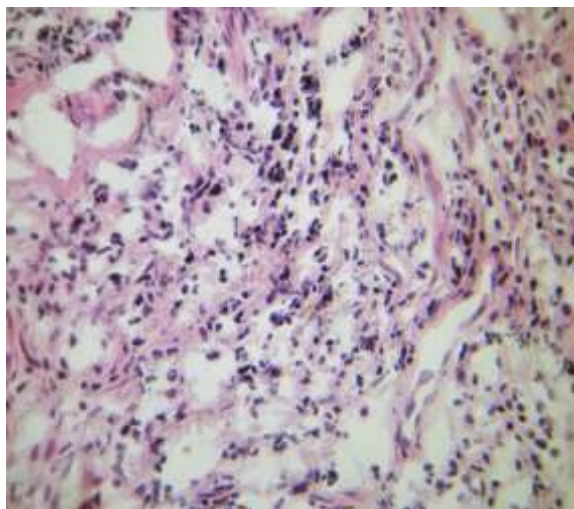


Figura 1 : Microfotografia representativa dos cortes histológicos do grupo Caso

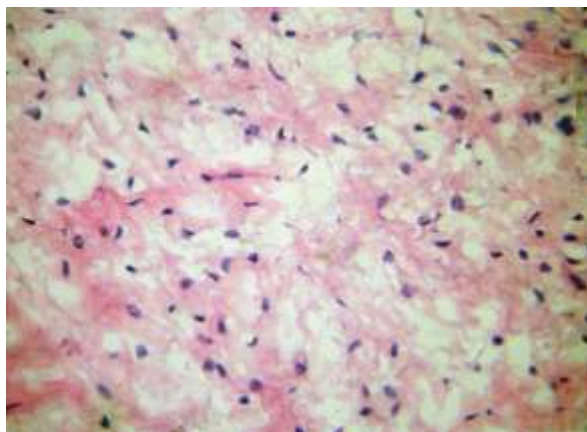


Figura 2 : Microfotografia representativa dos cortes histológicos do grupo Controle

5.2 - MSP para o IFN- γ

A Tabela 1 ilustra os dados representativos do MSP para o gene do IFN- γ (Anexo III- Artigo). Todas as amostras do grupo caso mostraram-se positivas para a seqüência não-metilada. Por sua vez, a maioria das amostras mostraram-se positivas para a seqüência metilada, o que demonstra a ocorrência de uma metilação parcial (Tabela 1). No grupo controle, 44.5% das amostras mostraram-se negativas para a seqüência não-metilada. Entretanto, neste grupo, todas se mostraram positivas para a seqüência metilada, correspondendo a uma metilação total do gene IFN- γ (Tabela 1).

Amostra	IFN- γ gene	
	M	U
Grupo Caso		
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	-	+
9	+	+
10	+	+
% de positivo	90%	100%
Grupo Controle		
11	+	+
12	+	+
13	+	-
14	+	+
15	+	-
16	+	-
17	+	+
18	+	-
19	+	+
% de positivo	100%	55.5%

Tabela 1 – Resultado do MSP para o gene de IFN- γ , onde **M** representa metilado e **U** não-metilado.

5.3 - Análise do seqüenciamento do gene da IL-10

Para a análise do seqüenciamento do gene da *IL-10* foram avaliadas 10 amostras, sendo 5 provenientes do grupo caso e 5 do grupo controle. Foi observado através do programa BiQ Analyser v2.00 uma taxa de conversão de 100% em todas as amostras após o tratamento com bissulfito de sódio, em ambos os grupos. Cada CpG foi analisado quanto ao padrão de metilação, quando observaram-se, de um modo geral, em ambos os grupos, que os CpGs localizados nas posições -634, -599, -373, -353, -350, -320, -185, da região promotora apresentaram metilação total, enquanto o CpG -110 mostrou metilação parcial. A figura 3 ilustra um eletroferograma representativo dos resultados obtidos. As figura 4 (grupo controle) e 5 (grupo caso) ilustram os resultados obtidos no seqüenciamento das amostras avaliadas.

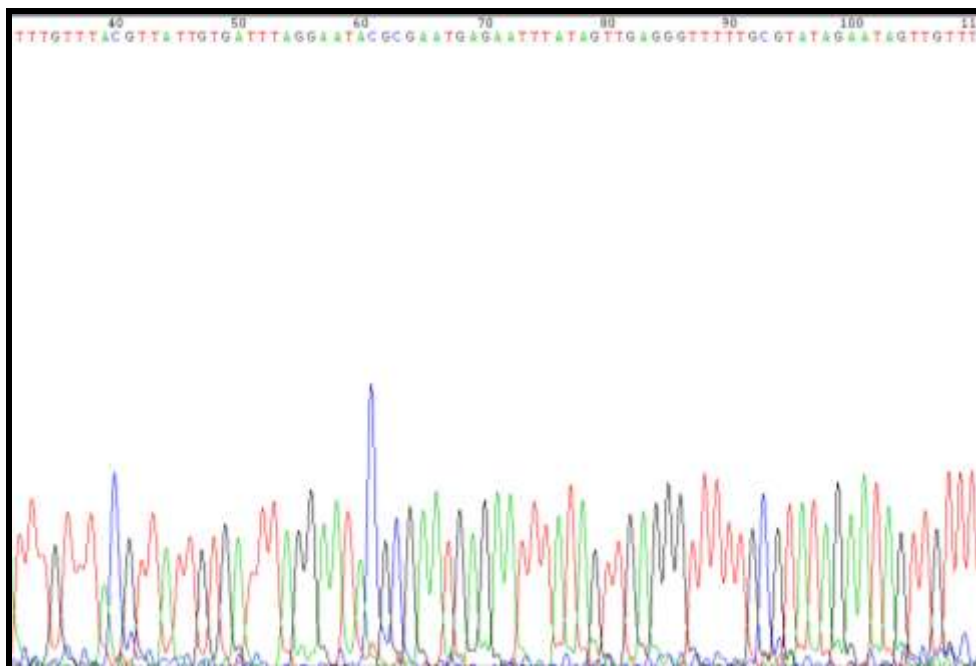


Figura 3- Eletroferograma representativo do seqüenciamento do gene IL-10 em uma amostra do grupo Controle. CpGs totalmente metilados.

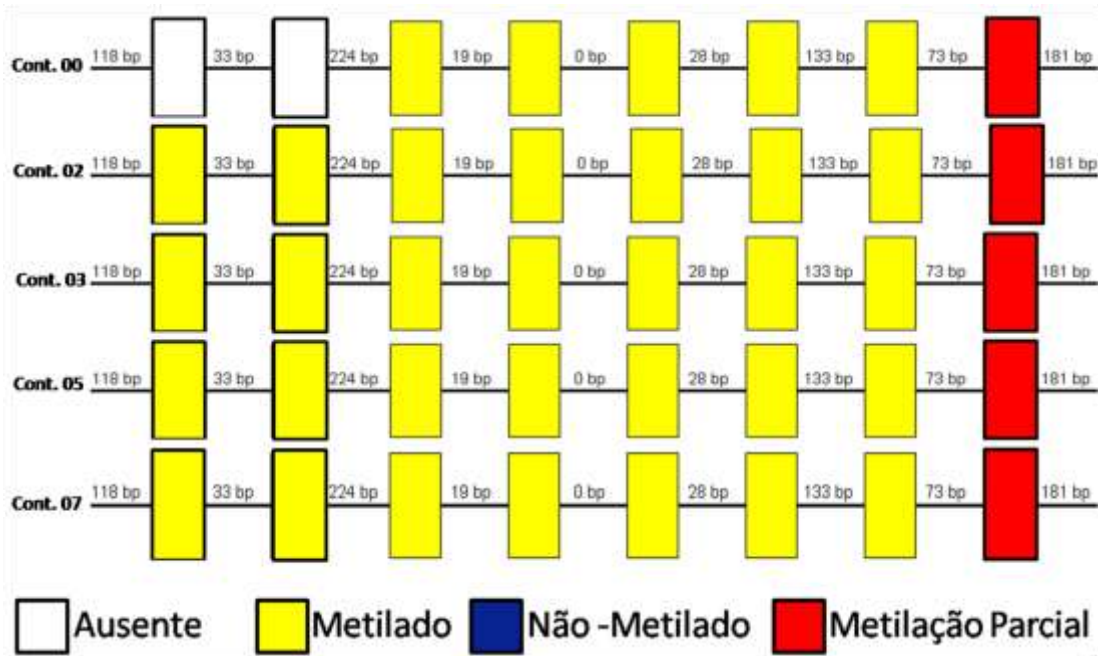


Figura 4- Resultados do sequenciamento do gene IL-10 do Grupo Controle. Metilado (apenas a presença do C no CpG), Não-metilado (apenas a presença de T no CpG), Metilação parcial (presença de C e T simultaneamente), Ausente (não foi possível fazer a leitura)

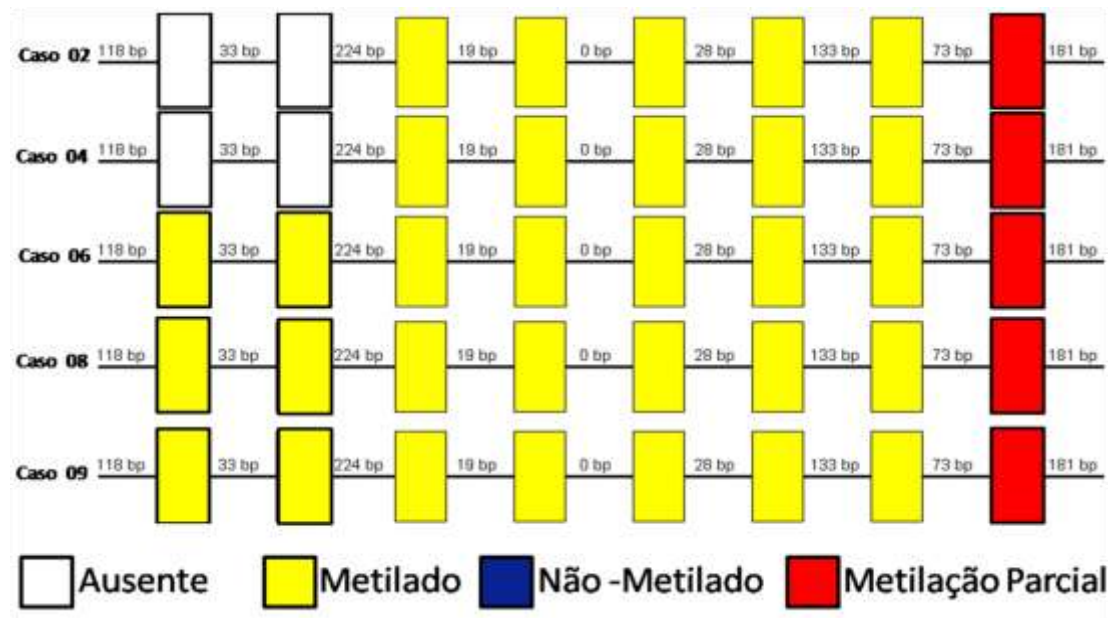


Figura 5- Resultados do sequenciamento do gene IL-10 do Grupo Caso. Metilado (apenas a presença do C no CpG), Não-metilado (apenas a presença de T no CpG), Metilação parcial (presença de C e T simultaneamente), Ausente (não foi possível fazer a leitura)

Discussão

Este estudo procurou avaliar o padrão de metilação do DNA em genes relacionados a duas citocinas envolvidas na modulação da resposta imune. As características anatômicas da polpa dental, que se encontra confinada em paredes rígidas que a mantêm distante da microbiota presente na cavidade oral, permitem que se estude este tecido em condições de presença ou ausência de um processo inflamatório. Neste estudo os espécimes clínicos foram obtidos a partir de dentes inclusos (sem inflamação) ou dentes portadores de lesões cariosas, indicados para o tratamento endodôntico (com inflamação).

A metilação total observada no grupo controle e a metilação parcial observada no grupo caso sugerem que a inflamação pulpar pode alterar o padrão de metilação, levando a uma hipometilação do gene do IFN- γ . Kersh e colaboradores, em 2006, observaram que a ausência de metilação na região promotora está associada a uma expressão aumentada dos níveis de mRNA de IFN- γ , principalmente em células T CD8+ efectoras. A perda da metilação do gene do IFN- γ em polpa dental inflamada talvez represente um mecanismo modulador da resposta inflamatória nesse tecido. Anteriormente, foi demonstrado por Hahn *et al.* (2000) que ocorre uma elevada prevalência de mRNA-IFN- γ nos estágios iniciais da inflamação pulpar. Da mesma maneira, Kim & Lim (2002) detectaram uma maior expressão de IFN- γ em polpas estimuladas com *Porphyromonas endodontalis* quanto comparadas ao controle, sem estímulo.

A região promotora do IFN- γ possui seis ilhas CpG localizadas nas posições -205, -190, -170, -52, -45 e -34 (Jones & Chen 2006). O primer utilizado neste estudo permitiu avaliar as ilhas localizadas nas posições -170 e -52. Anteriormente, Jones & Chen (2006) observaram que a posição -52 é a principal controladora da expressão gênica associada à metilação. Observaram ainda que a expressão do IFN- γ estava

associado à hipometilação nessa posição, quando se comparou células Th1 com linfócitos T *naive*. Entretanto, a expressão de IFN- γ pode também ser modulada por fatores de transcrição específicos e pela estrutura da cromatina (Kersh, *et al.*, 2006).

O padrão de metilação do gene IFN- γ observado neste estudo demonstrou uma hipometilação que difere dos resultados do estudo que analisou a metilação do genoma em tecidos com inflamação crônica, onde uma hipermetilação foi detectada (Stenvinkel *et al.*, 2007). Essa contradição provavelmente se justifica pelo fato de que, neste estudo, analisaram-se genes específicos e não o padrão de metilação do genoma. Segundo Backdahl *et al.* (2009) o estresse oxidativo gerado em processos inflamatórios crônicos pode ser um fator que promova a redução geral no padrão de metilação.

Durante uma inflamação pulpar ocorre uma expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias (Hahn, *et al.*, 2000). A hipometilação do gene do IFN- γ , observada neste estudo, no grupo caso, sugere uma maior expressão desta citocina, como demonstrado em estudos anteriores (Hahn, 2000; Kim & Lim 2002). Dong *et al.*, (2007) encontraram uma associação entre o padrão de metilação da região promotora do gene IFN- γ e a sua transcrição, observando uma hipometilação em células produtoras. Por sua vez, Kwon *et al.* (2008), ao avaliarem ilhas CpG na região promotora do IFN- γ , não encontraram relação entre a expressão gênica e o padrão de metilação. Ao analisar o padrão de metilação do gene do IFN- γ e o perfil de células T, Young *et al.* (1994) observaram que em células Th1 (produtoras de IFN- γ) a região promotora estava completa ou parcialmente hipometilada, ao passo que em células Th2 a região promotora encontrava-se hipermetilada.

No que diz respeito ao IFN- γ , o mecanismo epigenético que estaria envolvido na modulação da resposta inflamatória no tecido pulpar seria a demetilação do DNA. Este processo poderia ocorrer pela inibição da metilação das novas fitas de DNA formadas

durante a replicação celular, como resultado de uma demetilação oxidativa, ou devido à possível ação de uma enzima, que induz a demetilação diretamente, removendo o radical metil da citosina (Kersh *et al.*, 2006).

Neste estudo avaliaram-se também o padrão de metilação em oito CpGs localizadas nas posições -634, -599, -373, -352, -350, -320, -185, -110 da região promotora do gene da IL-10. De um modo geral, os CpGs, totalmente e parcialmente metilados, foram observados tanto no grupo caso quanto no controle. Uma alta frequência de metilação total foi observada nas ilhas CpGs -373, -352, -350, -320 e -185 em ambos os grupos, sugerindo que a metilação destas regiões é um evento comum na polpa dental.

Apesar de uma menor frequência de metilação total ter sido observada nas posições -634 e -599, principalmente no grupo controle. Szalmas *et al.* (2008) relataram que o padrão de metilação da região promotora proximal (-110) é a principal determinante do silenciamento transcricional da expressão da IL-10 humana em células epiteliais normais e neoplásicas. Estes autores detectaram a não metilação da posição -110 em células produtoras da IL-10, enquanto a presença de metilação determinou o silenciamento, uma vez que esta região associa-se à ligação de um importante fator de transcrição, o STAT3. Diante disto, como não se observaram diferenças nesta posição, a alteração no padrão de metilação entre os grupos avaliados neste estudo não permite sugerir diferença na expressão desta citocina.

Dong *et al.* (2007) não observaram, em células T recuperadas em sangue periférico humano, uma associação entre um padrão de metilação e a expressão de IL-10, diferentemente do observado com o IFN- γ . Estes autores concluíram que o padrão de metilação desse gene não é fator decisivo em sua transcrição. Segundo outros pesquisadores (Bonilla-Henao, 2005; Johnson & Belshaw, 2008) embora seja

reconhecido o papel da metilação do DNA no controle de muitos processos imunes, o grau do silenciamento transcricional depende da quantidade de citosinas metiladas nos CpG e suas posições dentro da seqüência.

A presença de inflamação crônica, infecção bacteriana ou estresse oxidativo podem também promover a demetilação do DNA. Especula-se que a inflamação persistente pode levar à metilação do DNA via inativação de citocinas sinalizadoras supressoras e via compostos halogênicos (Backdahl *et al.*, 2009). Torna-se relevante assim, definir se os mecanismos epigenéticos que ocorrem em tecidos infectados, tais como aquele de polpas de dentes portadores de uma lesão cáriosa ativa, são o resultado do contato microbiano direto ou são consequência da resposta inflamatória gerada por eles (Bobetsis *et al.*, 2007). Apesar de o presente estudo ser um passo importante no entendimento da interação metilação-processo inflamatório no tecido pulpar, estudos posteriores são necessários para se definir a ação de fatores epigenéticos na modulação da resposta inflamatória neste tecido. Para tanto seria interessante comparar o padrão de metilação com a expressão de mRNA e a produção de proteínas. Assim, avaliar-se-ia não só os fatores relacionados à transcrição, mas também à tradução.

Conclusões

- A presença de metilação é um evento observado no tecido pulpar na presença e ou ausência de inflamação;

- A hipometilação do gene IFN- γ foi observada em polpa dental inflamada;

- Não se observou diferença na alteração do padrão de metilação do gene da IL-10 na posição -110, na presença e ou na ausência de inflamação. Os CpGs -634 e -599 necessitam de estudos adicionais para se definir sua influencia em processos inflamatórios.

Referencias bibliográficas

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. (2000) *Cellular and molecular immunology*. 4^a edição. Pennsylvania: W. B. Saunders company, 553p.

Adachi T, Nakanishi T, Yumoto H *et al.* (2007) Caries-related bacteria and cytokines induce CXCL10 in dental pulp. *J.Dent.Res.* **86**, 1217-1222.

Adcock IM, Tsaprouni L, Bhavsar P, Ito K (2007) Epigenetic regulation of airway inflammation. *Curr.Opin.Immunol* **19**, 694-700.

Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S (2007) Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J.Intern.Med.* **261**, 511-528.

Armenante F, Merola M, Furia A, Tovey M, Palmieri M (1999) Interleukin-6 repression is associated with a distinctive chromatin structure of the gene. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4483-4490.

Backdahl L, Bushell A, Beck S (2009) Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **41**, 176-184.

Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I (2003) Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* **21 Suppl 2**, S12-S23.

Baylin SB (2005) DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat.Clin.Pract.Oncol.* **2 Suppl 1**, S4-11.

Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ, Syed SA (1982) Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. *J.Oral Pathol.* **11**, 439-450.

Beutler B (2004) Innate immunity: an overview. *Mol.Immunol.* **40**, 845-859.

Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6-21.

Bobetsis YA, Barros SP, Lin DM *et al.* (2007) Bacterial infection promotes DNA hypermethylation. *J.Dent.Res.* **86**, 169-174.

Bogdan C (2000) The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr.Opin.Immunol.* **12**, 419-424.

Bonilla-Henao V, Martinez R, Sobrino F, Pintado E (2005) Different signaling pathways inhibit DNA methylation activity and up-regulate IFN-gamma in human lymphocytes. *J.Leukoc.Biol.* **78**, 1339-1346.

Brakensiek K, Langer F, Schlegelberger B, Kreipe H, Lehmann U (2005) Hypermethylation of the suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) in myelodysplastic syndrome. *Br.J.Haematol.* **130**, 209-217.

- Bruniquel D, Schwartz RH (2003) Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat.Immunol* **4**, 235-240.
- Cho KS, Elizondo LI, Boerkoel CF (2004) Advances in chromatin remodeling and human disease. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **14**, 308-315.
- Cooper MD, Alder MN (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124**, 815-822.
- de Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J.Exp.Med.* **174**, 1209-1220.
- Dong J, Ivascu C, Chang HD *et al.* (2007) IL-10 is excluded from the functional cytokine memory of human CD4+ memory T lymphocytes. *J.Immunol.* **179**, 2389-2396.
- Dorman SE, Holland SM (2000) Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**, 321-333.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J.Immunol.* **147**, 3815-3822.
- Fitzpatrick DR, Wilson CB (2003) Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. *Clin.Immunol.* **109**, 37-45.
- Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S (2001) IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* **22**, 556-560.
- Goldenberg D, Harden S, Masayeva BG *et al.* (2004) Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* **130**, 39-44.
- Hahn CL, Best AM, Tew JG (2000) Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infect.Immun.* **68**, 6785-6789.
- Hahn CL, Liewehr FR (2007) Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J.Endod.* **33**, 643-651.
- Holland GR (1994) Morphological features of dentine and pulp related to dentine sensitivity. *Arch.Oral Biol.* **39 Suppl**, 3S-11S.
- Johnson IT, Belshaw NJ (2008) Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. *Food Chem.Toxicol.* **46**, 1346-1359.
- Jones B, Chen J (2006) Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. *EMBO J.* **25**, 2443-2452.
- Jones PA (2001) Cancer. Death and methylation. *Nature* **409**, 141, 143-141, 144.
- Kass SU, Pruss D, Wolffe AP (1997) How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet.* **13**, 444-449.

Kerezoudis NP, Olgart L, Fried K (1993) Localization of NADPH-diaphorase activity in the dental pulp, periodontium and alveolar bone of the rat. *Histochemistry* **100**, 319-322.

Kersh EN, Fitzpatrick DR, Murali-Krishna K *et al.* (2006) Rapid demethylation of the IFN-gamma gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. *J.Immunol.* **176**, 4083-4093.

Kim SA, Lim SS (2002a) T lymphocyte subpopulations and interleukin-2, interferon-gamma, and interleukin-4 in rat pulpitis experimentally induced by specific bacteria. *J.Endod.* **28**, 202-205.

Kim SA, Lim SS (2002b) T lymphocyte subpopulations and interleukin-2, interferon-gamma, and interleukin-4 in rat pulpitis experimentally induced by specific bacteria. *J.Endod.* **28**, 202-205.

King, C.A.; Wills, M.(2005) Immunology I: innate immunity. *Surgery.* **23**, p. 304-308.

Kitajima Y, Ohtaka K, Mitsuno M *et al.* (2008) Helicobacter pylori infection is an independent risk factor for Runx3 methylation in gastric cancer. *Oncol.Rep.* **19**, 197-202.

Kwon NH, Kim JS, Lee JY, Oh MJ, Choi DC (2008) DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN-gamma promoter genes in patients with bronchial asthma. *J.Clin.Immunol.* **28**, 139-146.

Kwong J, Lo KW, Chow LS, Chan FL, To KF, Huang DP (2005) Silencing of the retinoid response gene TIG1 by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. *Int.J.Cancer* **113**, 386-392.

Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2000) Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat.Immunol.* **1**, 311-316.

Law AS, Baumgardner KR, Meller ST, Gebhart GF (1999) Localization and changes in NADPH-diaphorase reactivity and nitric oxide synthase immunoreactivity in rat pulp following tooth preparation. *J.Dent.Res.* **78**, 1585-1595.

Levenson JM, Sweatt JD (2005) Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat.Rev.Neurosci.* **6**, 108-118.

Licastro F, Candore G, Lio D *et al.* (2005) Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun.Ageing* **2**, 8.

Lind GE, Thorstensen L, Lovig T *et al.* (2004) A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol.Cancer* **3**, 28.

Lu HX, Xiao MZ, Niu ZY *et al.* (2002a) Effect of IL-1ra on human dental pulp cells and pulpal inflammation. *Int.Endod.J.* **35**, 807-811.

Lu Q, Kaplan M, Ray D *et al.* (2002b) Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **46**, 1282-1291.

- Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM (2003) The dual role of IL-10. *Trends Immunol* **24**, 36-43.
- Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.* **19**, 683-765.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal MR, Vieira P, Mosmann TR (1993) Interleukin-10. *Annu.Rev.Immunol* **11**, 165-190.
- Mosmann TR (1994) Properties and functions of interleukin-10. *Adv.Immunol.* **56**, 1-26.
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* **420**, 846-852.
- Netea MG, van der Meer JW, van DM, Kullberg BJ (2003) Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends Immunol.* **24**, 254-258.
- Nile CJ, Read RC, Akil M, Duff GW, Wilson AG (2008) Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**, 2686-2693.
- O'Garra A (1998) Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* **8**, 275-283.
- Pereira, F.E.L.; Bogliolo, L. (1994) Inflamações. In: FILHO, Geraldo B. *et al. Bogliolo Patologia. 5ª edição.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., p. 111-143.
- Richardson B (2003) DNA methylation and autoimmune disease. *Clin.Immunol.* **109**, 72-79.
- Santos KF, Mazzola TN, Carvalho HF (2005) The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **38**, 1531-1541.
- Sekigawa I, Kawasaki M, Ogasawara H *et al.* (2006) DNA methylation: its contribution to systemic lupus erythematosus. *Clin.Exp.Med.* **6**, 99-106.
- Siqueira Júnior, José Freias; Dantas, Carlos José Saboia. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação.** 1ª Edição. Rio de Janeiro: Editora médica científica Ltda, 2000, 238p.
- Stenvinkel P, Karimi M, Johansson S *et al.* (2007) Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease? *J.Intern.Med.* **261**, 488-499.
- Szalmas A, Banati F, Koroknai A *et al.* (2008) Lineage-specific silencing of human IL-10 gene expression by promoter methylation in cervical cancer cells. *Eur.J.Cancer* **44**, 1030-1038.
- Tosi MF (2005) Innate immune responses to infection. *J.Allergy Clin.Immunol.* **116**, 241-249.

Trowbridge, H. O.; Emling, R. C. (1996) *Inflamação – Uma revisão do Processo*. 6ed. São Paulo: Quintessence Editora Ltda, 172p.

Vercelli D (2004) Genetics, epigenetics, and the environment: switching, buffering, releasing. *J.Allergy Clin.Immunol.* **113**, 381-386.

von der WT, Beebe AM, Roopenian DC, Coffman RL (1996) Early production of IL-4 and induction of Th2 responses in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4+NK1.1- T cell population. *J.Immunol.* **157**, 4421-4427.

Willems F, Marchant A, Delville JP *et al.* (1994) Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur.J.Immunol.* **24**, 1007-1009.

Wilson AG (2008) Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *J.Periodontol.* **79**, 1514-1519.

Young HA, Ghosh P, Ye J *et al.* (1994) Differentiation of the T helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN-gamma gene. *J.Immunol* **153**, 3603-3610.

Yu C, Abbott PV (2007) An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust.Dent.J.* **52**, S4-16.

Zehnder M, Delaleu N, Du Y, Bickel M (2003) Cytokine gene expression--part of host defence in pulpitis. *Cytokine* **22**, 84-88.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO NOS GENES IL-1, IL-10 E
IFN- γ EM POLPA DENTAL HUMANA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar deste projeto de pesquisa e, portanto, será solicitado que leia este material de modo a garantir que está sendo informado da natureza deste estudo e de como será sua participação no mesmo, se concordar em fazê-lo. A assinatura deste termo irá indicar que você foi informado e que concorda em participar.

Um consentimento informado por escrito é solicitado pelas regulamentações, antes da participação em qualquer pesquisa, de forma a assegurar que o paciente entendeu a natureza e os riscos de sua participação e para que o mesmo possa decidir em participar ou não, de forma livre e esclarecida.

OBJETIVO

A cárie dental, uma doença provocada por bactérias, pode levar a necessidade de tratamento endodôntico (tratamento de canal) dependendo da sua gravidade. Isso acontece, porque dentro dos nossos dentes existe um tecido, susceptível à inflamação. Quando esse tecido inflama é necessário sua remoção e obturação ou fechamento do espaço que anteriormente era ocupado por ele, nisso consiste o tratamento de canal. Os

tecidos inflamados produzem moléculas para controlarem a inflamação. Entre essas moléculas estão: a interleucina-1 (IL-1), interleucina-10 (IL-10) e o interferon-gama (IFN- γ). A produção dessas moléculas é influenciada pela estrutura do DNA, que contem os genes necessários para essa produção. O DNA está sujeito a alterações estruturais, que influenciam na atividade dos genes, ou seja, se ou genes produzirão ou não moléculas. No tecido inflamado pode haver uma mudança na estrutura dos genes, pois algumas moléculas que são produzidas nesse tecido, não são produzidas nos tecidos normais. Portanto, o objetivo dessa pesquisa é avaliar se existem alterações estruturais nos genes relacionados à síntese de IL-1, IL-10 e IFN- γ , quando comparamos o tecido inflamado com o normal.

CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

Você está sendo convidado a participar deste estudo, pois necessita de um tratamento endodôntico (tratamento de canal) que envolve a remoção do tecido inflamado necessário à realização de nossa pesquisa. O porquê necessita da remoção de terceiro molar incluso, que possui em seu interior o tecido, em condição de normalidade, necessário a realização de nossa pesquisa.

Para que decida ou não em participar desta pesquisa, você deve entender o suficiente a respeito do protocolo, de modo a fazer um julgamento preciso. Se houver alguma dúvida que você não tenha entendido sobre este estudo, após a leitura deste consentimento informado, por favor, dirija suas perguntas ao Dr. Fabiano Pereira Cardoso.

Os tecidos necessários à execução desse estudo serão obtidos nas clínicas de Endodontia e Cirurgia da Faculdade de Odontologia da UFMG, de pacientes que necessitarem que tratamento endodôntico ou da remoção cirúrgica de terceiros molares

inclusos. Sua parte laboratorial será realizada no Laboratório de Patologia da mesma instituição

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (COEP/UFMG).

Qualquer dúvida referente à sua participação poderá ser esclarecida no COEP (Tel.: 3409-4592- Av.: Presidente Antonio Carlos, 6627/ 2º andar, sala 2005).

PROCEDIMENTOS

Serão selecionados 10 pacientes que necessitem de tratamento endodôntico e 10 pacientes que necessitem da remoção do terceiro molar incluso. O tecido que fica dentro do dente desses pacientes será submetido a análise para avaliar se existe diferença na estrutura do DNA, relacionado aos genes IL-1, IL-10 e IFN- γ , entre os pacientes.

Todos os pacientes estarão sob tratamento nas clínicas de endodontia e cirurgia da Faculdade de Odontologia da UFMG, obedecendo às normas da instituição. Após a coleta, as amostras serão analisadas em laboratório.

BENEFÍCIOS

As informações obtidas com a sua participação podem resultar no melhor entendimento dos fenômenos relacionados ao controle da resposta inflamatória, não só no dentes, mas também em outras partes do corpo.

PARTICIPAÇÃO E COMPENSAÇÃO

A participação neste estudo não terá nenhum custo a sua pessoa. A coleta das amostras será realizada durante o seu tratamento, sendo assim não serão necessárias consultas adicionais, além das previstas para a realização do tratamento necessário.

DIREITO DE ABANDONAR O ESTUDO

A participação neste estudo é voluntária. Você tem o direito de se recusar em participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento. Caso recuse, mesmo assim terá o seu tratamento concluído.

CONFIDENCIABILIDADE DOS DADOS

Está garantida a confiabilidade das informações que você fornecer. As informações serão codificadas e mantidas em local reservado o tempo todo, tendo somente acesso às informações os pesquisadores que participam da pesquisa.

AUTORIZAÇÃO

Antes de fornecer meu consentimento pela assinatura deste termo, os métodos foram explicados a mim e as minhas perguntas foram respondidas. Eu entendo que posso perguntar a qualquer momento e que estou livre para retirar-me deste estudo sem causar constrangimentos ou afetar meus cuidados odontológicos. Uma cópia assinada deste termo de consentimento me será concedida.

Declaro ter lido e entendido os termos da pesquisa a ser realizada por:

Fabiano Pereira Cardoso (aluno de Mestrado em Odontologia, área de concentração em Endodontia, da FO-UFMG).

Rua Hermílio Alves 332 / Santa Tereza / Belo Horizonte-MG

Tel: 3467-4000

Assinatura do paciente _____ Data __/__/__

Assinatura do investigador _____ Data __/__/__

Fabiano Pereira Cardoso

ANEXO II – Cópia da autorização do COEP/UFMG (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais) para realização da pesquisa.



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

Parecer nº. ETIC 390/08

Interessado(a): Prof. Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho
Departamento de Odontologia Restauradora
Faculdade de Odontologia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 14 de outubro de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "Identificação do padrão de metilação de Genes IL-1, IL-10 e IFN- γ em polpa dental humana" bem como o Termo 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

Anexo III

Title: Methylation pattern of *IFN- γ* gene in human dental pulp

Fabiano Pereira Cardoso¹, Michelle Beatriz Viana¹, Antônio Paulino Ribeiro
Sobrinho², Paula Rocha Moreira¹, Ricardo Santiago Gomez¹

¹Laboratory of Molecular Biology, Department of Oral Surgery and Pathology,

² Department of Restorative Dentistry; ^{1, 2} School of Dentistry, Universidade
Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

*Corresponding author: Dr. Ricardo S. Gomez, Laboratório de Biologia Molecular,
Faculdade de Odontologia-Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio
Carlos 6627, Pampulha, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Phone: 55-31-3409-2477. FAX:55-31-3409-2430

e-mail address: rsgomez@ufmg.br

Abstract

DNA methylation is characterized by addition of methyl groups in cytosines within CpG islands. Unmethylated islands are related with transcriptionally active structure, whereas methylated DNA recruits methyl-binding proteins that promotes chromatin compactation. Although epigenetic events can influence the expression of cytokines, it has not been already investigated in dental pulp. The purpose of the present study was to evaluate the methylation status of IFN- γ gene in human dental pulp affected by inflammation compared with pulp tissue cells of impacted molar teeth. The MSP was used to verify the DNA methylation status. While total methylation was only observed in some samples of the normal dental pulp tissues, partial methylation was found in most of the cases of inflamed pulp tissues. In conclusion, the present study gives the first evidence of the possible participation of epigenetic events in inflamed dental pulp.

Keywords: methylation, interferon-gamma, dental pulp, inflammation

Introduction

Epigenetics is described as modifications in conformational structure of DNA which do not involve changes in the sequence, making it more or less accessible to transcription (1, 2). DNA methylation is the most common epigenetic event characterized by addition of methyl group in cytosines within CpG regions (2). Unmethylated CpG islands are related with transcriptionally active structure, whereas methylated DNA recruits methyl-binding proteins leading to chromatin compaction and preventing the binding of transcription factors (3, 4).

Evidence is emerging about the importance of epigenetic regulatory mechanisms in controlling the inflammatory response (5). Epigenetic changes occur in cytokine genes in human cells, affecting the ability of the cell to express cytokines (6). Despite the small number of studies that evaluated CpG methylation in cytokine genes, the initial findings have offered insights into the pathogenesis of some inflammatory diseases, such as chronic gastritis (7), airway inflammation (1), periodontitis (8) and bronchial asthma (9).

Few studies evaluating the methylation pattern in IFN- γ gene have been performed. CpG methylation in the IFN- γ promoter is considered a negative transcriptional regulator of IFN- γ production (10). IFN- γ is an important proinflammatory cytokine released mainly from T-cells in response to antigenic stimulation and involved in activation of macrophages and endothelial cells (11). It also regulates the antigen-specific immune response and potentiates many of the actions of TNF- α on endothelial cells (12). A high prevalence of IFN- γ mRNA in inflamed pulps

from shallow caries has been detected, being the initial stages of pulpal inflammatory response characterized by a cell-mediated type-1 immune response (13). Due to important role of IFN- γ cytokine in the development of pulp inflammation, the presence of methylation in promoter region of this gene may interfere in immune response elaborated during the inflammatory process.

Although epigenetic events can influence the expression of cytokines, it has not been already investigated in dental pulp. The purpose of the present study was to evaluate the methylation status of IFN- γ gene in human dental pulp affected by inflammation compared with pulp tissue cells of impacted molar teeth. We found evidence for the first time that epigenetic events may be important to IFN- γ expression in human dental pulp.

Materials and methods

Sample collection

A total of 19 samples of human dental pulp from individuals under treatment at the Dentistry School, Universidade Federal de Minas Gerais, were included in this study. The samples were stratified into two groups: case group (n=10) composed by pulp tissue from tooth with symptomatic pulpitis and the control group (n=9) composed by pulp tissue from impacted third molars. The case group was composed of 6 female and 4 male subjects (median age 32 years, ranging from 15 to 57) and the samples were collected during conventional endodontic therapy. The control group was composed of 9 female subjects (median age 25 years, ranging from 16 to 29), and the samples were collected after surgical removal of impacted third molars. Pulp tissues were immediately included in Tissue-tek (Sakura Finetek, CA, USA) and stored at -80°C. The present study was approved by the local Ethics Committee (ETIC 390/08).

Histological study

Two sections of 5µm from frozen samples were stained by haematoxylin-eosin to histopathological evaluation. The histological sections were submitted to inflammatory cell counting (original magnification x400) and the total number of inflammatory cells was obtained for each sample.

DNA extraction

The remaining fragments of the frozen samples were used to DNA extraction. The genomic DNA was extracted with the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. The concentration of DNA was determined with a spectrophotometer.

Bisulfite modification

Methylation pattern of tissues were assessed using DNA modification by bisulfite treatment, similar to that reported by Goldenberg *et al.* (14). With the bisulfite treatment, unmethylated cytosines of DNA are converted to uracil while methylated cytosines remain unmodified. The bisulfite conversion was carried out with 1µg of DNA, which was denatured by incubation with 2µl of NaOH 3M for 20 minutes at 50°C. Then the samples were treated with sodium bisulfite (2.5M) and hydroquinone (1M) for 3 hours at 70°C. Modified DNA samples were purified with Wizard DNA purification resin according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA) and eluted in distilled H₂O. NaOH (3M) was added to complete the modification and this was followed by ethanol precipitation. The pellets were resuspended and 200 ng of DNA were used for the PCR assay.

Methylation-specific Polymerase Chain Reaction (MSP)

MSP distinguishes the presence of methylation based on alterations produced after bisulfite treatment of DNA using specific primers for methylated or unmethylated DNA. The primer sequences used were previously described (15).

PCR was carried out in a total volume of 25 μ l containing 2.5 μ l 10X PCR buffer, 5 μ l dNTP-mix (1mM of each), 0.75 μ l Magnesium Chloride (50mM), 0.5 μ l of each primer (20pmol/ μ l), 2.5 units of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and 200 ng of DNA. The amplification conditions consisted of 94°C for 4 min followed by 30 cycles of 94°C for 1min, 48°C for 1min and 72°C for 1min, and final elongation at 72°C for 7min. The reactions were performed into a thermocycler (Eppendorf AG, Germany). PCR products were visualized in silver stained 6.5% polyacrilamyde gel.

DNA treated with SssI methylase (New England Biolabs, Ipswich, Mass, USA) was used as positive control in methylated reactions, while the DNA from peripheral blood mononuclear cells was used as control for unmethylated reactions, similarly to previous reports (16, 17).

Positive amplification only for methylated primers was interpreted as total methylation. Positive amplification for both methylated and unmethylated primers were considered as partial methylation, according with Zhang *et al.* (18).

Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed using the Mann-Whitney test from BioEstat 4.0 software (Belém, Brazil). A p-value of < 0.05 was considered significant.

Results

Histopathological evaluation

The median number of inflammatory cells in the control group was 10, ranging from 2 to 75. In the case group the median was 61, ranging from 23 to 180. The Mann-Whitney test showed increased number of inflammatory cells in the case group ($p=0.0025$). The inflammatory infiltrate, when present, was predominantly mononuclear. Only two samples of the case group showed predominance of polymorphonuclear neutrophils.

MSP results

MSP representative data of *IFN- γ* gene are illustrated in figure 1. All the samples of the case group showed positive unmethylated sequence and all but one showed methylated sequence as well (partial methylation of *IFN- γ* gene) (Table 1). In the control group, 44.5% of the samples were negative for unmethylated sequence but were positive for the methylated sequence of the gene (total methylation of *IFN- γ*) (Table 1).

Discussion

The dental pulp may be considered a unique tissue due to its morphological characteristics and its physical confinement (19). This tissue is protected of oral environment by a rigid-walled pulp chamber, which gives the dental pulp favorable conditions for investigation of methylation-inflammation interaction. The interaction between DNA methylation and inflammation may have relevance for inflammatory diseases, as the pulpitis. Microarray studies have shown different levels of 445 genes

expression in pulp of healthy and carious teeth (20). Furthermore, upregulation of various cytokines mRNA were reported in symptomatic dental pulps (13, 21). Therefore, differentiated cytokines expression may occur during inflammatory reaction in dental pulp.

In present study, the profile of total methylation was only observed in some samples of the control group, in contrast with the profile of partial methylation verified in most of the samples in the case group, indicate that the presence of inflammation in human dental pulp is associated with loss of DNA methylation in the promoter region of the IFN- γ gene. Since unmethylated sequence of gene is correlated with high mRNA levels of IFN- γ (22), the loss of DNA methylation may represent a defense mechanism of pulp during the inflammation. Our findings may explain the high prevalence of IFN- γ mRNA in inflamed pulps and a cell-mediated type-1 immune response in initial stages of pulp inflammation (13).

The epigenetic control observed in inflamed pulp may be explained by occurrence of DNA demethylation. It has been postulated that DNA demethylation can occur by blocking methylation of newly synthesized DNA during replication (23), or due to unknown enzymatic factor with demethylase activity (24), and also due to an oxidative demethylation (25). Although the process involving demethylation is poorly known, IFN- γ promoter demethylation was reported in memory CD8T cells after antigenic stimulation (22).

Despite of many questions about the epigenetic control of inflammatory response, clues of epigenetic influence in the development of immune response may be important in diseases with an inflammatory profile. In conclusion, our study shows that inflammation in human dental pulp is associated with loss of total methylation of the promoter region of the IFN- γ gene. This finding suggests that epigenetic events may be

relevant to IFN- γ modulation in dental pulp. Further studies are necessary to determine the functional relevance of these alterations.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. Dr. RS Gomez and Dr. PR Moreira are research fellows of CNPq.

References

- 1-Adcock IA, Tsaprouni L, Bhavsar P, Ito K. Epigenetic regulation of airway inflammation. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:694-700.
- 2 -Bäckdahl L, Bushell A, Beck S. Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41:176-184.
- 3-Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA *et al.* Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19:187-191.
- 4-Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429:457-63.
- 5-Wilson AG. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *J Periodontol* 2008; 79:1514-1519.
- 6-Sanders VM. Epigenetic regulation of Th1 and Th2 cell development. *Brain Behav Immun* 2006; 20: 317-324.
- 7-Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim JH, Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastric, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol* 2003; 163:1551-1556.
- 8- Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. Rethinking periodontal inflammation. *J Periodontol* 2008; 79: 1577-1584.
- 9-Kwon N-H, Kim J-S, Le J-Y, Oh M-J, Choi D-C. DNA methylation and he expression of IL-4 and IFN-g promoter genes in patients with bronchial asthma. *J Clin Immunol* 2008; 28: 139-146.
- 10-White GP, Watt PM, Holt BJ, Holt PG. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma

gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells. *J Immunol* 2002; 168: 2820-2827.

11-Aitken AE, Morgan ET. Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P4502C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1687-1693.

12-Doherty GM, Lange JR, Langstein HN, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Evidence for IFN-gamma as a mediator of the lethality of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1992;149:1666 –70.

13-Hahn C, Best AM, Tew JG. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infect Immun* 2000; 68: 6785-6789.

14-Goldenberg D, Harden S, Masayeva BG *et al.* Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130:39-44.

15-Bonilla-Henao V, Martinez R, Sobrinho F, Pintado E. Different signaling pathways inhibit DNA methylation activity and up-regulate IFN- γ in human lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2005; 78:1339-1346.

16-Brakensiek K, Langer F, Kreipe H, Lehmann U. Absence of p21(CIP1), p27(KIP1) and p57(KIP2) methylation in MDS and AML. *Leuk Res* 2005; 29:1357-1360.

17-Kwong J, Lo KW, Chow LS, Chan FL, To KF, Huang DP. Silencing of the retinoid response gene *TIG1* by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2005; 113: 386-392.

18-Zhang C, Li K, Wei L *et al.* p300 expression repression by hypermethylation associated with tumour invasion and metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2007; 60:1249-1253.

19-Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J* 2007; 52: S4-S16.

20-McLachlan JL, Smith AJ, Bujalska IJ, Cooper PR. Gene expression profiling of pulpal tissue reveals the molecular complexity of dental caries. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1741: 271-281.

21-Zehnder M, Delaleu N, Du Y, Bickel M. Cytokine gene expression- part of host defence in pulpitis. *Cytokine* 2003; 22: 84-88.

22-Kersh EN, Fitzpatrick DR, Murali-Krishma K et al. Rapid demethylation of the IFN- γ gene occurs in memory but not naïve CD8 T cells. *The Journal of Immunology* 2006; 176:4083-4093.

23-Ooi S, Bestor T. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* 2008; 133: 1145-1148.

24-Bruniquel D, Schwartz RH. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol* 2003; 4: 235-240.

25-Hamm S, Just G, Lacoste N, Moitessier N, Szyf M, Mamer O. On the mechanism of demethylation of 5-methylcytosine in DNA. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 1046-1049.

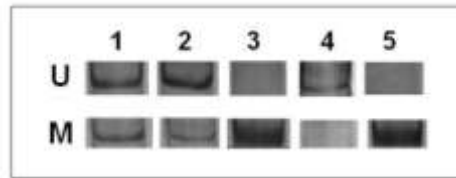


Figure 1 - MSP representative data of the *IFN- γ* gene. U shows PCR products when amplified by unmethylated primers and M shows PCR products when amplified by methylated primers. Lane 1 and 2 shows samples with partial methylation. Lane 3 and 5 shows samples with total methylation. Lane 4 shows an unmethylated sample.

Table 1- Results of MSP for IFN- γ gene

Samples		IFN- γ gene	
Case	M	U	
group			
1	+	+	
2	+	+	
3	+	+	
4	+	+	
5	+	+	
6	+	+	
7	+	+	
8	-	+	
9	+	+	
10	+	+	
% of	90%	100	
positivity		%	
Control			
group			
11	+	+	
12	+	+	
13	+	-	
14	+	+	
15	+	-	
16	+	-	
17	+	+	
18	+	-	
19	+	+	
% of	10	55.	
positivity	0%	5%	