Fabiano Pereira Cardoso

AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO EM GENES RELACIONADOS À RESPOSTA IMUNE EM POLPA DENTAL HUMANA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

2013

Fabiano Pereira Cardoso

AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO EM GENES RELACIONADOS À RESPOSTA IMUNE EM POLPA DENTAL HUMANA

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Odontologia – área de concentração em Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Paulino R. Sobrinho

Co-orientadora: Prof. Dra. Paula Rocha Moreira

Faculdade de Odontologia – UFMG

Belo Horizonte

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

C268a
2013
T

Cardoso, Fabiano Pereira.
Avaliação do padrão de metilação em genes relacionados à resposta imune em polpa dental humana / Fabiano Pereira Cardoso. – 2013.

66 f. : il.

Orientador: Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.
Co-orientadora: Paula Rocha Moreira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Polpa dentária. 2. Metilação de DNA. I. Ribeiro Sobrinho, Antônio Paulino. II. Moreira, Paula Rocha. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK D047

Elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Odontologia - UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação do padrão de metilação em genes relacionados à resposta imune em polpa dental humana

FABIANO PEREIRA CARDOSO

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em ODONTOLOGIA, área de concentração ENDODONTIA.

Aprovada em 25 de junho de 2013, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Frank Ferreira Silveira
PUC Minas

Prof(a). Paula Rocha Moreira
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Warley Luciano Fonseca Tavares
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Micena Roberta Miranda Alves e Silva
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). GIL MOREIRA JUNIOR
UNIVERSIDADE DE ITAÚNA

Belo Horizonte, 25 de junho de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO
FABIANO PEREIRA CARDOSO

Realizou-se, no dia 25 de junho de 2013, às 14:00 horas, Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Avaliação do padrão de metilação em genes relacionados à resposta imune em polpa dental humana* , apresentada por FABIANO PEREIRA CARDOSO, graduado no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em ODONTOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Frank Ferreira Silveira (PUC Minas), Prof(a). Paula Rocha Moreira (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Warley Luciano Fonseca Tavares (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Micena Roberta Miranda Alves e Silva (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). GIL MOREIRA JUNIOR (UNIVERSIDADE DE ITAÚNA).

A Comissão considerou a tese:

(X) Aprovada
( ) Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa
( ) Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 25 de junho de 2013.

Prof(a). Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho
Doutor - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof(a). Frank Ferreira Silveira
Doutor - Unesp Araraquara

Prof(a). Paula Rocha Moreira
Doutora - Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Warley Luciano Fonseca Tavares
Doutor - Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Micena Roberta Miranda Alves e Silva
Doutora - Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). GIL MOREIRA JUNIOR
Doutor - Universidade Federal de Minas Gerais

Confere com o original
25 / 06 / 2013
Secretaria do Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia da UFMG
Em 25/06/2013
Ass:

AGRADECIMENTOS

A minha Mãe, irmã, e minha namorada Erika Oliveira*, pelo incentivo e apoio constantes, sem vocês não teria chegado até aqui.*

Aos professores Antônio Paulino, orientador, e Paula Rocha, co-orientadora, pela paciência, apoio e incentivo, devo a vocês a conclusão deste trabalho.

Ao professor Luiz Carlos Feitosa, pela amizade, oportunidades, conselhos e apoio.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da UFMG, em especial a professora Maria Guiomar, que foram fundamentais para minha formação.

Aos amigos Warley Tavares e Ana Cecília, pela troca de ideias, apoio e amizade.

Aos colegas da Faculdade de Odontologia da UFMG, em especial Erika Sales e Isabella Peixoto.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular FO –UFMG e do Labic ICB-UFMG, em especial Simone Amorino, Jeane Correia e Telma Arão.

Ao colegiado de Pós-graduação da FO-UFMG, em especial Laís, Zuleica e Bete.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), *pelo auxílio concedido durante o doutorado.*

A Faculdade de Odontologia da UFMG .

RESUMO

Receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como o Toll-like receptor 2 (TLR-2) e o TLR4, participam da ativação do sistema imune por microrganismos quando a polpa dental está inflamada. Supõe-se que seus níveis de expressão em tecido pulpar humano podem ser modulados por fatores epigenéticos, especialmente a metilação do DNA. O objetivo deste estudo foi avaliar o padrão de metilação dos genes TLR-2 e CD14 – um correceptor do TLR4 - em polpas dentais saudáveis e inflamadas. Adicionalmente, verificou-se a associação entre o padrão de metilação do gene interferon-gama (IFN-γ), previamente por nós identificado, com sua expressão gênica em polpas dentárias. Concluímos não haver alterações no padrão de metilação dos genes TLR2 e CD14 quando comparamos o tecido pulpar normal com o inflamado. Em relação ao gene IFN-γ, observamos uma correlação positiva entre seu padrão de metilação e sua expressão gênica.

Palavras-Chave: CD14, interferon gama, metilação de DNA, polpa dentária e TLR-2.

ABSTRACT

Evaluation of Pattern of Mehylation in Genes Related to the Immune Response in Human Dental Pulp

Pattern-recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptor 2 (TLR-2) and TLR4, participate in the activation of the immune system by microorganisms when dental pulp is inflamed. However, the expression levels of PRRs can be modulated by epigenetic factors, especially DNA methylation. In this study, the methylation statuses of the TLR-2 and CD14 (TLR4 co-receptor) genes in healthy and inflamed human dental pulp were examined. Additionally, we assessed whether the methylation pattern of cytokine gene interferon-gamma (IFN-γ), previously identified, is associated with an altered expression of this gene.

Keywords: CD14, IFN-γ, DNA methylation, dental pulp and TLR-2

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLRs	Receptores Lectina do Tipo C
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
MHCs	Moléculas Apresentadoras de Antígeno
MSP	Reação em Cadeia de Polimerase Metilação Específica
NK	Células *Natural Killer*
NLRs	Receptores do Tipo *NOD*
PAMPs	Padrão Molecular Associado a Patógenos
PCR	Reação em Polimerase de Cadeia
PPRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
TLRs	Toll-like Receptors
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1 - Introdução 11

2 - Revisão de Literatura 15

2.1 Polpa Dental 16

2.2 Resposta imune pulpar.....17

2.3 Interfero-gama.....18

2.4 TLR2 e CD14..... 20

2.5 Epigenética 21

2.6 Metilação do DNA 22

3 - Objetivos 25

3.1 Objetivo Geral 26

3.2 Objetivos Específicos 26

4 - Materiais e métodos 27

4.1 Aspectos éticos 28

4.2 Caracterização da Amostra 28

4.3 Coleta e processamento do material para a análise 29

4.4 Extração do DNA 30

4.5 Avaliação do Padrão de Metilação dos Genes TLR2 e CD14.....30

4.6 Avaliação dos níveis de transcrição do IFN-γ..... 32

4.7 Análises estatísticas 33

5 - Resultados e Discussão.....34

6 - Conclusões 52

7 - Referências bibliográficas 54

Anexo I 60

Anexo II 62

1-Introdução

A polpa dental é caracterizada como um tecido conjuntivo frouxo especializado de origem ectomesenquimal. Dentre as células presentes, destacam-se os odontoblastos, responsáveis pela produção do tecido dentinário. Há uma íntima relação entre os tecidos pulpar e dentinário, os quais formam uma entidade funcional: o complexo dentino-pulpar, que é constituído por tecidos histologicamente distintos. Uma particularidade do tecido pulpar consiste no fato de encontrar-se confinado entre paredes dentinárias rígidas. Isso limita sua capacidade de expansão durante episódios de vasodilatação e aumento do exsudato, eventos comumente observados em processos inflamatórios. Apesar das limitações físicas, o tecido pulpar é imunocompetente (Cohen e Hargreaves, 2011).

Quando submetido a danos físicos, químicos ou mecânicos, o complexo dentino-pulpar responde a essas agressões, a princípio, produzindo dentina reacional e esclerose dentinária e, mais tardiamente, reações vasculares imunoinflamatórias são observadas. Esses são alguns dos eventos que caracterizam a resposta imune neste tecido, cujo objetivo é eliminar o agente agressor e permitir que o reparo tecidual ocorra (Pereira & Bogliolo, 1998).

Uma variedade de moléculas participa do processo de resposta imune, no qual citocinas atuam como mediadoras. Algumas delas são pró-inflamatórias, como o interferon-gama (IFN- γ), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) e a interleucina-1α (IL -1α); outras, anti-inflamatórias, como a IL-4, a IL-10 e a IL-13 (Netea *et al.*, 2003; von der *et al.,* 1996; O'Garra, 1998).

Outras moléculas, denominadas receptores de reconhecimento padrão (PRRs), participam da identificação dos principais agressores do tecido pulpar: as bactérias e seus subprodutos. Os PRRs identificam componentes microbianos classificados como

padrão molecular associado aos patógenos (PAMPs) (Kumar, Kawai e Akira, 2009). Dentre os PRRs, destacamos o TLR2, associado ao reconhecimento de bactérias Gram-positivas e o TLR4 que, junto ao seu co-receptor CD14, reconhece bactérias Gram-negativas (Zähringer *et al.*, 2008; Tukhvatulin *et al.*, 2010).

A síntese molecular, tanto das citocinas quanto do PRRs, decorre de uma sequência de eventos responsáveis pela transcrição e tradução gênica. Ambas podem ser influenciadas por uma variedade de eventos que favorecem ou impedem sua ocorrência. A transcrição, por exemplo, pode ser influenciada por fatores epigenéticos que permitem que genes sejam silenciados ou ativados, sem que haja alteração na sequência de nucleotídeos do DNA (Bird, 2002).

Um dos eventos epigenéticos mais importantes é a metilação do DNA, que consiste na adição de um grupo metil à citosina, normalmente, localizada em uma sequência CpG no DNA (em que *C* representa citosina, *p* o grupamento fosfato e *G* guanina). Em geral, há grandes concentrações de CpGs, denominadas ilhas CpGs, na região promotora dos genes. Quando metiladas, essas ilhas podem impedir a transcrição gênica. A presença ou não da metilação em um gene determina o seu padrão de metilação (Bird, 2002; Fitzpatrick e Wilson, 2003; Santos, Mazzola e Carvalho, 2005).

Previamente, nosso grupo observou que o gene IFN-γ apresentou um padrão de metilação diferente na polpa dental humana inflamada quando comparado ao tecido pulpar normal (Cardoso *et al.*, 2010). Assim, um dos objetivos do nosso trabalho foi avaliar se o padrão de metilação do gene da IFN-γ estaria associado a uma expressão alterada desse gene. Uma vez que foi descrito na literatura que as moléculas TLR2 e CD14 são expressas em tecido pulpar inflamado (Hirao *et al.*, 2009; Kaneko *et al.*,

2010), objetivou-se também verificar possíveis diferenças no padrão de metilação desses genes.

2-Revisão de Literatura

2.1-Polpa Dental

A polpa dental é um tecido conjuntivo frouxo especializado, ricamente inervado, vascularizado e celularizado, cujas células derivam da crista neural, sendo, portanto, um tecido de origem ectomesenquimal. Os odontoblastos, responsáveis pela especialização, são células responsáveis pela produção do tecido dentinário e auxiliam na defesa pulpar. Possuem, no interior dos túbulos dentinários, prolongamentos celulares que podem alcançar a junção amelo-dentinária.

As células mais numerosas do tecido pulpar são os fibroblastos, responsáveis pela produção dos percursores das fibras colágenas e da substância fundamental amorfa. Além disso, o tecido pulpar apresenta células envolvidas na resposta imune como os linfócitos, macrófagos e células dentríticas (Yu e Abbott, 2007; Lopes e Siqueira Jr, 2011).

O tecido pulpar possui uma inervação sensitiva e autônoma. Sua função sensorial é determinada por fibras nociceptivas que, independentemente do estímulo captado – mecânico, térmico ou químico –, levam o sistema nervoso a interpretá-lo como dor (Cohen e Hargreaves, 2011; Siqueira Jr e Lopes, 2011).

A vascularização pulpar é feita por vasos sanguíneos de pequeno calibre, cuja comunicação com o restante do sistema circulatório é estabelecida por meio do forame apical. Fato que, somado ao de estar confinada em paredes rígidas, pode comprometer a sua vitalidade durante os eventos inflamatórios (Cohen e Hargreaves, 2011; Siqueira Jr e Lopes, 2011).

2.2-Resposta imune pulpar

A ação da resposta imune é dinâmica, visa a evitar e a eliminar possíveis agressões ao corpo humano e a reparar tecidos lesados, permitindo que a homeostase seja mantida. A ativação se dá diante de uma variedade de estímulos físicos, químicos e biológicos e varia em intensidade e duração em função da virulência, quantidade e permanência do agente agressor, assim com em função das características imunes do próprio indivíduo (Pereira & Bogliolo, 1998).

Como em outros tecidos conjuntivos, a resposta imune pulpar é dividida em inata e adaptativa. Ambas influenciam-se mutuamente e estão intimamente relacionadas (Bergenholtz, 1981; Albiger *et al.*, 2007). A resposta inata não é específica, entretanto pode reconhecer distintos padrões moleculares compartilhados por diferentes grupos de agentes microbianos agressores, definidos como "padrão molecular associado a patógenos" (PAMPs) (Tosi, 2005; Hahn e Liewehr, 2007a). Essas moléculas são identificadas por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que, quando ativados, permitem uma rápida mobilização de mecanismos capazes de eliminar esses agentes (Staquet *et al.*, 2011). Já a resposta adaptativa é antígeno-específica e pode potencializar a ação protetora da resposta inata (Hahn e Liewehr, 2007b).

A resposta inflamatória pulpar difere dos demais tecidos, principalmente por estar envolta por tecidos mineralizados (esmalte e dentina) o que pode comprometer sua circulação sanguínea, em caso de edema gerado pela resposta imune em decorrência de sua ativação por agente agressor (Cohen e Hargreaves, 2011).

Os principais indutores de resposta inflamatória no tecido pulpar são as bactérias e seus subprodutos. Diante dessa agressão, inicia-se uma resposta imune, visando a

limitar e a eliminar o agente agressor e a reparar o dano tecidual (Bergenholtz, 1981). A interação entre as bactérias e as células do hospedeiro, invariavelmente, resulta na liberação de citocinas, cujo tipo variará dependendo dos componentes envolvidos nessa interação (Wilson, 2008).

Citocinas são peptídeos que podem apresentar ação sistêmica e/ou local produzidos por células do sistema imune, assim como por células epiteliais e endoteliais, dentre outras (Basset *et al.*, 2003; Beutler, 2004). Sua produção, normalmente um evento breve e autolimitado, inicia-se após a ativação celular e consequente transcrição do gene envolvido. Essa transcrição pode ser influenciada por uma variedade de fatores, além dos estímulos microbianos (Abbas, 2000; Siqueira Junior, 2000).

Algumas citocinas possuem ação pró-inflamatória, enquanto outras anti-inflamatória. São pró-inflamatórias: o Interferon-gama (IFN-γ), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), a interleucina-1α (IL-1α), a IL-1β, a IL-12 e a IL-18. Entre as anti-inflamatórias, encontram-se a IL-4, a IL-10, a IL-13 e o TGF-β (Von Der Weid *et al.*, 1996; O'garra, 1998; Netea *et al.*, 2003). Vários estudos têm demonstrado a expressão de citocinas no órgão pulpar inflamado (Hahn, Best e Tew, 2000; Lu *et al.*, 2002; Fitzpatrick e Wilson, 2003).

2.3- Interferon-gama

O interferon-gama (IFN-γ) é uma citocina predominantemente produzida por linfócitos T e células *natural killer* (NK) em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios e imunes. Sua produção é fundamental para que a resposta imune contra

patógenos seja eficiente. Seus receptores são expressos por praticamente todas as células do corpo, o que permite sua atuação em muitos órgãos e tecidos (Frucht *et al.*, 2001).

O IFN-γ interfere na modulação da resposta inflamatória, ativando macrófagos e células endoteliais e estimula a secreção de quimiocinas – citocinas com ação quimiotática – e de outros mediadores inflamatórios. Adicionalmente, aumenta a atividade de células apresentadoras de antígenos e a capacidade de reconhecimento de antígenos por linfócitos T. Ativa a transcrição de genes que participam da atividade antiviral, apoptose, processamento de antígenos, expressão de moléculas apresentadoras de antígeno (MHCs) e o desenvolvimento de linfócitos Th1. Além disso, induz macrófagos a destruir e/ou restringir o crescimento de bactérias alvos (Dorman e Holland, 2000; Billiau e Matthys, 2009).

Interferências na 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.

Durante uma inflamação pulpar, ocorre uma expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias, tendo sido demonstrado um aumento na prevalência do mRNA do IFN-γ nos estágios iniciais da inflamação pulpar (Hahn, Best e Tew, 2000). Da mesma maneira, observou-se uma maior expressão de IFN-γ em polpas estimuladas com *Porphyromonas endodontalis* quando comparadas àquelas não estimuladas. (Kim e Lim, 2002).

2.4- TLR2 e CD14

A entrada de patógenos no hospedeiro inicia interações complexas entre uma variedade de moléculas derivadas desses patógenos e sensores do hospedeiro. O objetivo dessas interações é a ativação de uma resposta imune efetiva na eliminação dos patógenos (Medzhitov, 2007). Assim, células do sistema imune inato, como macrófagos, células dentríticas e neutrófilos, expressam uma família de receptores denominados receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Os PRRs identificam moléculas derivadas dos patógenos denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os PAMPs não são essenciais à virulência microbiana, entretanto são fundamentas para a sobrevivência dos microrganismos. Os PRRs incluem uma variedade de famílias como os receptores do tipo *toll* (TLRs), receptores do tipo *NOD* (NLRs), receptores lectina do tipo C (CLRs), dentre outros (Kumar, Kawai e Akira, 2009). A sensibilização dos PRRs pelos PAMPs ocorre em vários compartimentos celulares, como a membrana celular, citoplasma celular e vesículas de endocitose (Kumar, Kawai e Akira, 2009). Essa sensibilização ativa fatores de transcrição, induzindo uma resposta inflamatória cujo objetivo é eliminar o microrganismo agressor (Trinchieri e Sher, 2007).

Alguns receptores do tipo *toll* (TLRs) estão localizados na membrana citoplasmática; outros, em compartimentos endossomais. Em humanos, até o momento, foram identificados dez receptores do tipo *toll* (Kumar, Kawai e Akira, 2009). O *toll-like receptor 2* (TLR2) está associado ao reconhecimento de microrganismos , dentre os quais figuram as bactérias Gram-positivas (Zähringer *et al.*, 2008). O TLR4 está associado ao reconhecimento de bactérias Gram-negativas (Staquet *et al.*, 2011). Este

último está associado a cofatores fundamentais à sua modulação, dos quais o CD14 é um dos mais importantes (Zähringer *et al.*, 2008).

A infecção endodôntica é polimicrobiana, formada por muitas das bactérias comensais encontradas na cavidade oral. Envolve tanto bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas, que, quanto à respiração, são comumente anaeróbias estritas ou facultativas (Narayanan e Vaishnavi, 2010).

A expressão dos genes CD14 e TLR2 já foi identificada em tecido pulpar. Kaneko e colaboradores, em 2010, analisando a polpa de dentes fraturados, observaram a expressão desses genes (Kaneko *et al.*, 2010). Um aumento na expressão de CD14, em células pulpares estimuladas por lipopolossacarídeo de *E. coli*, e de TLR-2, por odontoblastos e fibroblastos pulpares após agressão microbiana, foram descritos (Botero *et al.*, 2006; Farges *et al.*, 2009).

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 e Sweatt, 2005). Epigenética, por sua vez, representa mudanças na expressão gênica decorrentes de modificações sofridas pelo DNA que não implicam alterações em sua sequência de nucleotídeos (Adcock *et al.*, 2007).

As alterações epigenéticas são alguns dos fatores que permitem que células com o mesmo genoma tenham fenótipos distintos. Referem-se às mudanças na expressão gênica que não decorrem de alterações na sequência de nucleotídeos e que podem ser mantidas durante a replicação celular (Bird, 2002). Enquanto a informação genética é

codificada pela sequência 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, Mazzola e Carvalho, 2005).

A regulação da expressão gênica por mecanismos epigenéticos é um processo dinâmico cujo *status* pode ser mudado, regulando-se a transcrição gênica em conjunto com fatores de transcrição (Vercelli, 2004).

Recentemente, estudos investigaram os eventos epigenéticos envolvidos em doenças crônicas com perfil inflamatório, tal como a artrite reumatoide, sendo observada a importância da metilação do DNA (Sánchez-Pernaute *et al.*, 2008).

2.6- 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 sua alteração conformacional, podendo interferir na transcrição gênica diretamente, impedindo a ligação de fatores de transcrição, ou indiretamente, atraindo repressores da transcrição (Kass, Pruss e Wolffe, 1997). Ocorre geralmente nas ilhas CpG, regiões ricas em citosinas e guanina na mesma fita de DNA (CG ou CpG, onde *p* representa o grupo fosfato), localizadas, normalmente, nas regiões promotoras dos genes (Baylin, 2005). Geralmente, genes metilados são silenciados, enquanto a região promotora de genes ativados encontra-se

com menor concentração de citosinas metiladas, ou seja, está hipometilada (Richardson, 2003).

O padrão de metilação é influenciado por diversos fatores. A dieta, por determinar a disponibilidade de nutrientes, influencia o fornecimento de grupos metil, fundamentais à ocorrência da metilação (Kim *et al.*, 2007). Poluentes ambientais, como cromo, níquel e cádmio, e medicamentos podem interferir na atividade da DNA metiltransferase, enzima que participa do processo de metilação (Salnikow e Costa, 2000; Tao *et al.*, 2000; Takiguchi *et al.*, 2003; Shiao *et al.*, 2005). Além disso, estudos têm demonstrado que tanto a inflamação quanto infecções podem levar a alterações epigenéticas (Ekström *et al.*, 2001; Maekita *et al.*, 2006; Hahn *et al.*, 2008).

Existem evidências de que algumas doenças humanas podem estar associadas a alterações no padrão de metilação. No câncer, o silenciamento epigenético por meio da metilação ocorre com mais frequência que as mutações ou as deleções, o que pode levar a um funcionamento anormal dos genes supressores de tumores (Jones, 2001; Baylin, 2005).

Embora existam alguns estudos sobre metilação em doenças com perfil inflamatório, estudos dos eventos epigenéticos em genes relacionados à resposta imune são escassos na literatura. Dentre os genes de citocinas já estudados, destaca-se o do IFN-γ, no qual um aumento na transcrição foi correlacionado com a hipometilação da região promotora do gene (Kersh *et al.*, 2006). Por sua vez, sua hipermetilação inibiu a expressão do mRNA e da proteína em linfócitos (Fitzpatrick e Wilson, 2003).

Considerando os estudos em genes de receptores do tipo *toll*, em células endoteliais humanas, não foi observada associação entre o padrão de metilação e a

expressão de TLR2 (Diesel *et al.*, 2012). Entretanto, observou-se associação entre baixos níveis de metilação e alta expressão gênica do TLR2 em pacientes com fibrose cística, quando comparado àqueles saudáveis (Shuto *et al.*, 2006). Nos tecidos gengivais inflamados, também foi observado um perfil hipermetilado de TLR2 associado à baixa expressão gênica. Em relação ao receptor CD14, a hipometilação do gene foi associada à alta expressão de CD14 em tecidos gengivais com periodontite crônica (Amorino, 2012). Esses dados sugerem que o padrão de metilação pode influenciar na expressão de genes relacionados à resposta imune. Dessa forma, a avaliação do padrão de metilação em genes associados a essa resposta em tecido pulpar poderá esclarecer importantes aspectos relacionados à resposta inflamatória nas doenças pulpares.

Além disso, destacamos que a polpa dental representa um excelente modelo de estudo para se avaliar a interação entre a inflamação e a metilação do DNA, por minimizar a influência de fatores externos, uma vez que se encontra confinada no interior do elemento dental. Livre, portanto, da possível contaminação, durante sua remoção, por tecidos vizinhos e da eventual influência de fatores externos ao organismo.

Nosso grupo, em experimentos anteriores, observou que o tecido pulpar humano inflamado está hipometilado considerando o gene IFN-γ, quando comparado ao tecido normal, evidenciando uma alteração no padrão de metilação durante o processo inflamatório (Cardoso *et al.*, 2010).

3- Objetivos

3.1- Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de metilação em genes relacionados à resposta imune pulpar humana.

3.2- Objetivos específicos

1. Avaliar o padrão de metilação nos genes TLR2 e CD14, no tecido pulpar com e sem inflamação.

2. Avaliar a transcrição gênica do IFN-gama e associar com seu padrão de metilação, no tecido pulpar com e sem inflamação.

4- Materiais e Métodos

4.1- Aspectos éticos

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

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

4.2- Caracterização da amostra

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

- Grupo controle (dentes sem agressão microbiana e inflamação pulpar)

Neste grupo, coletou-se o tecido pulpar de vinte terceiros molares, totalmente inclusos, indicados para exodontia (n=20). Foram incluídos neste estudo aqueles dentes que se encontravam totalmente intraósseos, ou aqueles cuja coroa apresentava-se completamente coberta por tecido gengival. Foram descartados os elementos dentais que sofreram fratura durante o procedimento cirúrgico de exodontia.

- Grupo caso (dentes com estímulo pulpar)

Neste grupo, coletou-se o tecido pulpar de vinte elementos dentais erupcionados, cariados e /ou restaurados, que haviam sido indicados para a exodontia ou tratamento endodôntico (n=20). Foram incluídos, neste grupo, aqueles dentes que responderam

positivamente aos testes de sensibilidade pulpar (teste térmico com frio) e não apresentaram exposição do tecido pulpar à cavidade oral.

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 a remoção do tecido aderido à sua superfície externa, ao que se seguiu a 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 a fratura do dente. O tecido pulpar foi removido, armazenado em *RNAholder* (*BioAgency*, Brasil) e congelado a -80°C.

-Amostras coletadas durante o tratamento endodôntico

Após a 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 *RNAholder* (*BioAgency*, Brasil) e congelado a -80°C.

4.4- Extração do DNA

Extraiu-se o DNA presente no tecido pulpar, utilizando-se o *QIAamp DNA Tissue Mini Kit* (Qiagen 51106), obedecendo-se às instruções do fabricante. O DNA obtido foi diluído em água e estocado a -20°C.

4.5- Avaliação do Padrão de Metilação dos Genes CD14 e TLR2

O padrão de metilação dos genes *CD14 e TLR2* foi avaliado utilizando-se o *EpiTect® Methyl Profiler qPCR Assayquantitative* (SABiosciences, Qiagen, Chatsworth, CA), de acordo com as instruções do fabricante. O método consiste na detecção do DNA remanescente após a clivagem com enzimas de restrição: uma enzima cliva o DNA metilado e outra enzima o DNA não metilado. O DNA sem enzimas é utilizado como controle positivo e o DNA com as duas enzimas como controle negativo. Após a digestão, as amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), no equipamento CFX96 (Biorad), utilizando-se *primers* que flanqueiam a região promotora de interesse. As figuras 1 e 2 mostram as regiões promotoras dos genes *CD14* e *TLR2*, detalhando os CpGs avaliados.

CAGGACCCGCCTCTGGCCTGTCGCAGCCTAGCTCACGGTCAAGGGCGGGAGCCTGCTGGGAAGCACGGCCGCGGGG
GCTCGCTCGGGGCCACCTGCCTGGAACTCAGCGCGAGGTCCAGAGTTCCCTCCGGCTGCGCAGCGGCGCACGTGCCC
CGTGGAAGGGGCGGTTCCCGCACCCCAGAAGGAGGGGGCGCCCGGCCGCGCGGACTTTCCCTTTTGCTTACTTCCTA
GTCCCGGGCAGGCCGGCTCGGAGGCAGCGAGAAAGCGCAGCCAGGCGGCTGCTCGGCGTTCTCTCAGGTGA

300pb

Figura 1: Sequência avaliada no gene TLR-2 (Esemble versão NCBI36/hg18 – Genome Browser reference NM_003264).

CCGACACCCCCACCGACAGGGTCGAACGTGCACAGGCTGGGACCACGCCGGAGTTCATTGAGCCCTCGTGGG
GGAGGGCAGTTCCAGGGACCAGGAAGGGATTCCCGTCCAGTGTCAGGTTATCCACCTCGGGCAGCTCGTCAG
GCTGCGGCGCCCTGTTCAGTCTGTTGCAGCTGAGATCGAGCACTCTGAGCTTGGCTGGCAGTCCTTTAGGCA

300pb

Figura 2: Sequência analisada no gene CD14 (Esemble versão NCBI36/hg18 – Genome Browser NCBI Reference Sequence: NM_000591).

As frações relativas de DNA metilado, não metilado e parcialmente metilado foram determinadas por comparação da quantidade observada em cada digestão com o controle positivo (sem enzima). Os dados foram analisados utilizando-se um programa fornecido pelo fabricante (SABiosciences, Qiagen, Chatsworth, CA).

4.6- Avaliação dos níveis de transcrição do IFN-γ

Extração e Quantificação do RNA

O RNA total foi extraído usando-se o reagente Trizol seguido pelo seu tratamento com RNAse-free DNAase I (Invitrogen Life Technologies), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1μg do RNA total, utilizando-se o *Kit superscript firststrand synthesis* (Invitrogen Life Technologies). O qPCR foi realizado utilizando-se a química pelo SYBR-green fluorescence quantification system, no Step-One real-time PCR em placas de 48 poços (Applied Biosystems, Warrington, UK). As condições do experimento foram: 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95° por 15 segundos e 56° por 1 minuto. A sequência de *primers* selecionados é a que segue: 5_-GGCATTTTGAAGAATTGGAAAG-3_ (*forward*) and 5_ -TTTGGATGCTCTGGTCATCTT-3_ (*reverse*), como descrito previamente (Dutzan *et al.*, 2009). Os *primers* usados para a beta-actina foram: 5_-TGCCGACAGGATGCAGAAG-3_ (f*orward*) e 5_-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGA-3_ (*reverse*). Os *primers* foram desenhados utilizando-se o programa *PrimerExpress* (*Applied Biosystems*).

A expressão relativa foi calculada utilizando-se o método $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Applied Biosystems User Bulletin No. 2), como previamente descrito (Livak e Schmittgen, 2001). Por sua vez, a expressão foi normalizada pela beta-actina endógena. Como calibrador, utilizou-se um *pool* de amostra de sangue recolhido de indivíduos saudáveis.

4.7- Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0 (Chicago, EUA). O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para verificar a distribuição das variáveis. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para se compararem dois grupos em uma variável. Foram consideradas estatisticamente significativas as análises que apresentaram $p<0,05$.

5- Resultados e Discussão

Os resultados, discussões e conclusões referentes à transcrição gênica do IFN-γ e à sua associação com o perfil de metilação do gene foram compilados no artigo científico intitulado *"Methylation Pattern of the INF-γ Gene in Human Dental Pulp"* - publicado no *Journal of Endodontics 2010,* volume 36, páginas 642-646 – a seguir.

Os resultados, discussões e conclusões referentes ao estudo do perfil de metilação dos genes CD14 e TLR2 foram compilados no artigo científico intitulado *"Methylation pattern of the CD14 and TLR2 genes in human dental pulp"* - submetido ao *Journal of Endodontics* – é apresentando na página 41.

Methylation Pattern of the *IFN-γ* Gene in Human Dental Pulp

Fabiano Pereira Cardoso, DDS,[*†] *Michelle Beatriz Viana, DDS,*[*†]
Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, DDS, PhD,[‡] *Marina Gonçalves Diniz, BSc, MSc,*[†]
João Artur Ricieri Brito, DDS, MSc,[*†] *Carolina Cavaliéri Gomes, DDS, PhD, MSc,*[§]
Paula Rocha Moreira, DDS, PhD, MSc,[*†] *and Ricardo Santiago Gomez, DDS, PhD*[*†]

Abstract

Introduction: DNA methylation is characterized by the addition of methyl groups in cytosines within cytosine-phosphate-guanine (CpG) islands. Unmethylated islands are related with transcriptionally active structure, whereas methylated DNA recruits methyl-binding proteins that promotes chromatin compaction. Although epigenetic events can influence the expression of cytokines, such events have not been investigated in dental pulp yet. The purpose of the present study was to evaluate the methylation status of the interferon γ (*IFN-γ*) gene in human dental pulp affected by inflammation compared with pulp tissue of impacted molar teeth and to verify the impact of methylation status in the expression pattern of the gene. **Methods:** Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used to verify the DNA methylation status of the *IFN-γ* gene in 16 human dental pulps affected by inflammation and in 16 pulp samples of impacted molar teeth. Histologic sections stained by hematoxylin-eosin were used for histopathological evaluation, and the expression of IFN-γ was assessed by quantitative real-time PCR (qPCR). **Results:** Although total methylation was observed in 43.75% of the samples of normal dental pulp tissues, partial methylation or unmethylation was found in 93.75% of the samples of inflamed pulp tissues. All the samples with total methylation in MSP showed no transcription of *IFN-γ*. The qPCR results showed expression of *IFN-γ* in 5 of 10 samples with partial methylation. **Conclusion:** The present study gives the first evidence of the possible participation of epigenetic events in the development of dental pulp inflammation. *(J Endod 2010;36:642–646)*

Key Words

Dental pulp, inflammation, interferon-gamma, methylation

Epigenetics is described as modifications in conformational structure of DNA that 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 the addition of the methyl group in cytosines within cytosine-phosphate-guanine (CpG) regions (2). Unmethylated CpG islands are related with a transcriptionally active structure, whereas methylated DNA recruits methyl-binding proteins leading to chromatin compaction and preventing the binding of transcription factors (3, 4) (Fig. 1).

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, initial findings have offered insights into the importance of methylation in 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 the *IFN-γ* gene have been performed. CpG methylation in the interferon gamma (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 tumor necrosis factor α on endothelial cells (12). A high prevalence of IFN-γ messenger RNA in inflamed pulps from shallow caries has been detected, being the initial stage of pulpal inflammatory response characterized by a cell-mediated type 1 immune response (13). Because of the important role of IFN-γ cytokine in the development of pulp inflammation, the presence of methylation in the promoter region of this gene may interfere in the immune response elaborated during the inflammatory process.

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

From the *Laboratory of Molecular Biology, †Department of Oral Surgery and Pathology, ‡Department of Restorative Dentistry; and §Department of General Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. Drs R.S. Gomez and P.R. Moreira are research fellows of CNPq.

Address requests for reprints to 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. E-mail address: rsgomez@ufmg.br.

0099-2399/$0 - see front matter

Copyright © 2010 American Association of Endodontists.

doi:10.1016/j.joen.2009.12.017

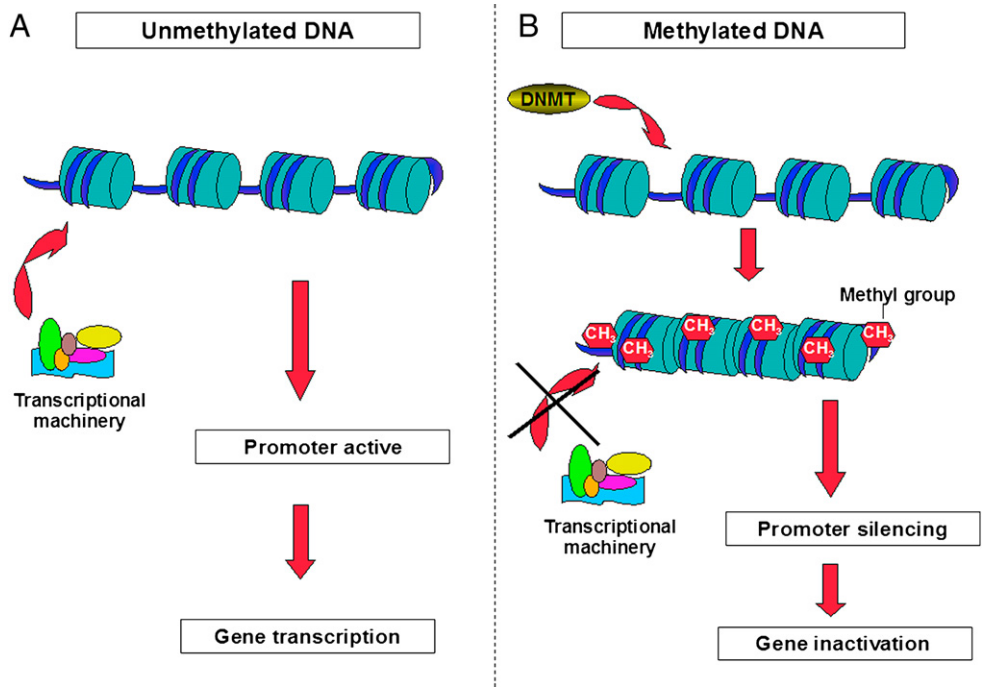


Figure 1. The effect of methylation in gene expression. (*A*) When the promoter region of DNA is unmethylated, there is an activation of gene expression. (*B*) DNA methylation occurs when methyl groups are added to cytosine nucleotides in specific areas of the gene by the enzyme DNA methyltransferase (DNMT). This chemical modification blocks the binding of transcription factors inhibiting gene transcription.

Materials and Methods

Sample Collection

A total of 32 samples of human dental pulp from individuals under treatment at the Dentistry School were included in this study. The samples were stratified into two groups: case group ($n = 16$) composed by pulp tissue from tooth with symptomatic pulpitis and the control group ($n = 16$) composed by pulp tissue from impacted third molars. The case group was composed of 8 female and 8 male subjects (age ranging from 11 to 57 years), and the samples were collected during conventional endodontic therapy. The control group was composed of 12 female and 4 male subjects (age ranging from 16 to 29 years), and the samples were collected after surgical removal of impacted third molars. Pulp tissues were immediately included in Tissue-tek (Sakura Finetek, CA) and stored at −80°C. For RNA extraction, a piece of the tissue was stored in RNAHolder (BioAgency Biotecnologia, Sao Paulo, Brazil) at −80°C. Because of the minute amount of tissue available, the extraction of DNA, RNA, and the analysis of microscopic sections were not possible to be done in all samples. The local ethics committee approved the present study.

Histologic Study

Two sections of 5 μm performed in 18 frozen samples were stained by hematoxylin-eosin for histopathological examination. The histological sections were submitted to inflammatory cell counting, and the mean number of inflammatory cells by a high-power field (original magnification × 400) was obtained.

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 by 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, whereas methylated cytosines remain unmodified. The bisulfite conversion was performed with 1 μg of DNA, which was denatured by incubation with 2 μL of NaOH 3 mol/L for 20 minutes at 50°C. Then, the samples were treated with sodium bisulfite (2.5 mol/L) and hydroquinone (1 mol/L) 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) and eluted in distilled H_2O. NaOH (3 mol/L) was added to complete the modification, and this was followed by ethanol precipitation. The pellet was resuspended, and 200 ng of DNA were used for the polymerase chain reaction (PCR) assay.

Methylation-specific Polymerase Chain Reaction

Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) distinguishes the presence of methylation based on alterations produced after bisulfite treatment of DNA using specific primers for methylated or unmethylated DNA. The primers sequences used were previously described (15). All the samples were analyzed by MSP.

Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a total volume of 25 $\mu\Lambda$ containing 2.5 μL 10× PCR buffer, 5 μL dNTP-mix (1 mmol/L of each), 0.75 μL of magnesium chloride (50 mmol/L), 0.5 μL of each primer (20 pmol/μL), 2.5 units of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), and 200 ng of DNA. The amplification conditions consisted of 94°C for 4 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 1 minute, 48°C for 1 minute and

72°C for 1 minute, and final elongation at 72°C for 7 minutes. The reactions were performed into a thermocyler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). PCR products were visualized in silver stained 6.5% polyacrylamide gel.

DNA treated with SssI methylase (New England Biolabs, Ipswich, MA) was used as positive control in methylated reactions, whereas 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 to the literature (18).

RNA Extraction and Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted using Trizol reagent, and the RNA obtained was treated with RNAse-free DNAase I (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. The complementary DNA was synthesized from 1 μg of total RNA using superscript first-strand synthesis system (Invitrogen Life Technologies). Real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed using SYBR-green fluorescence quantification system in a Step-One real-time PCR 48-well plate (Applied Biosystems, Warrington, UK). The reaction conditions were 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 56°C for 1 minute. The sequences of primers used for IFN-γ were 5°-GGCATTTTGAAGAATTGGAAAG-3° (forward) and 5° -TTTGGATGCTCTGGTCATCTT-3° (reverse) as previously described (19). The primers used for b-actin were 5°- TGCCGACAGGATGCAGAAG-3° (forward) and 5°- CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGA-3° (reverse) and were designed using PrimerExpress software (Applied Biosystems).

Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Applied Biosystems User Bulletin No. 2) as previously described (20), and the expression data were normalized with endogenous b-actin. The data were presented as the relative quantity of target IFN-γ normalized to endogenous b-actin and relative to a calibrator sample. As a calibrator, we used a pool of blood samples of healthy individuals.

Statistical Analysis

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

Results

MSP Results

MSP results of *IFN*-γ gene are illustrated in Figure 2. In the control group, 43.75% (n = 7) of the samples showed total methylation of *IFN*-γ gene (positive only for the methylated sequence of the gene), and 56.25% (n = 9) showed partial methylation (positive for both methylated and unmethylated sequences) (Fig. 2). The majority of the samples (93.75%) from case group showed positive unmethylated sequence. In the case group, 6.25% (n = 1) were totally methylated, 87.5% (n = 14) of the samples were partially methylated, and 6.25% (n = 1) were unmethylated (showed amplification only with the unmethylated primers) (Fig. 2). Representative data of the MSP reactions of *IFN*-γ gene are illustrated in Figure 3.

Histopathological Evaluation

A total of 18 samples was submitted to 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 the predominance of polymorphonuclear neutrophils.

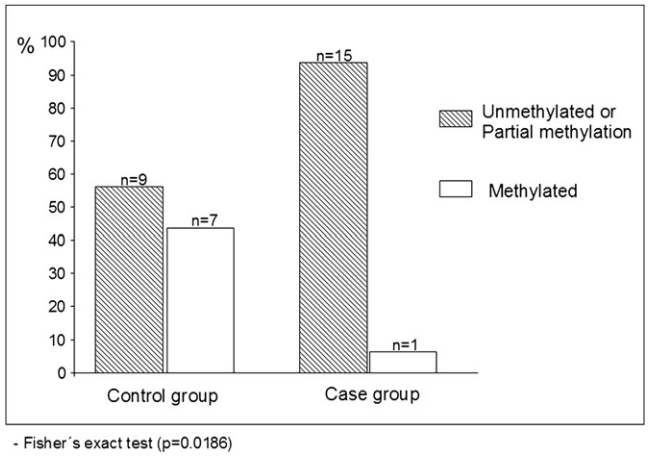


Figure 2. Results of the methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) of the *IFN*-γ gene in dental pulp tissues.

Table 1 shows the MSP status from each case submitted to histopathological analysis. The mean number of inflammatory cells in the methylated samples was not statistically different from the unmethylated/partial methylated samples (p = 0.086).

qPCR Results

In order to evaluate the association between the methylation of *IFN*-γ and the transcription of the gene, the qPCR was performed in seven and six samples of the control and case groups, respectively (Table 2). Because undetectable levels of IFN-γ messenger RNA were observed in three of the six samples of the case group, no statistical difference was observed between IFN-γ expression in control versus case groups. However, the expression of the gene in the control group was clearly lower than that observed in the case group. All the three samples totally methylated did not show expression of IFN-γ. On the other hand, five of ten samples with partial methylation showed transcription of the gene ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ ranging from 1.75 to 2457.09).

Discussion

The dental pulp may be considered a unique tissue because of its morphologic characteristics and its physical confinement (21). This tissue is protected from the oral environment by a rigid-walled pulp

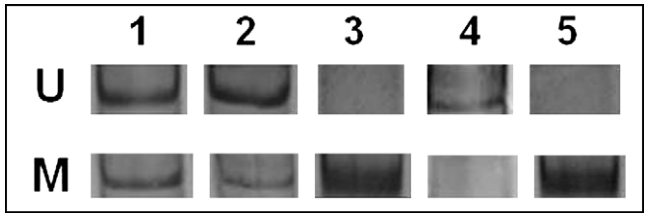


Figure 3. Representative data of MSP of the *IFN*-γ gene. U shows PCR products when amplified by unmethylated primers and M shows PCR products when amplified by methylated primers. Lane 1 and 2 shows samples with partial methylation. Lane 3 and 5 shows samples with total methylation. Lane 4 shows an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

TABLE 1. Results of MSP of the *IFN-γ* Gene in Pulp Tissues from Impacted Third Molars (Control Group) and in Pulp Tissues from Teeth with Symptomatic Pulpitis (Case Group)

Samples	*IFN-γ* gene		Inflammatory cells	
Control group	Methylated	Unmethylated	Mean Number	Infiltrate
1	+	+	8	Mononuclear
2	+	+	5	Mononuclear
3	+	-	21	Mononuclear
4	+	+	2	Mononuclear
5	+	-	12	Mononuclear
6	+	-	3	Mononuclear
7	+	-	75	Mononuclear
8	+	+	20	Mononuclear
% of positivity	100%	50%		
Case group				
9	+	+	58	Mononuclear
10	+	+	23	Mononuclear
11	+	+	91	Mononuclear
12	+	+	64	Polymorphonuclear
13	+	+	123	Polymorphonuclear
14	+	+	23	Mononuclear
15	+	+	30	Mononuclear
16	-	+	37	Mononuclear
17	+	+	180	Mononuclear
18	+	+	115	Mononuclear
% of positivity	90%	100%		

Eight and six samples of the control and case groups, respectively, did not present sufficient tissue available for histological analysis.

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 the pulp of healthy and carious teeth (22). Furthermore, up-regulation of various cytokines messenger RNA were reported in symptomatic dental pulps (13, 23). Therefore, differentiated cytokines expression may occur during inflammatory reaction in dental pulp.

The pulp insult is a dynamic process that depends on both the invading microorganisms and host responses to them (24). Several cells and inflammatory mediators are involved in the initial pulpal responses to caries, including IFN-γ cytokine. IFN-γ activates macrophages to augment phagocytosis of microbes and promotes type 1 T-cell responses in adaptive immunity (25). IFN-γ has also been considered an important cytokine in the pathogenesis of experimentally induced pulp infection as endogenous suppressor of periapical lesions

TABLE 2. Results of MSP for *IFN-γ* gene and Expression of IFN-γ by Real-time PCR

Samples	*IFN-γ* gene		IFN-γ expression
	Methylated	Unmethylated	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Control group	+	+	Undetectable
	+	+	Undetectable
	+	-	Undetectable*
	+	+	1.75
	+	-	Undetectable*
	+	+	2.35
	+	+	Undetectable
Case group	+	+	2,457.09
	+	+	Undetectable
	+	-	Undetectable*
	+	+	15.5
	+	+	Undetectable
	+	+	142.22

*The three samples with total methylation did not show expression of IFN-γ.

development (26). Considering the important role of this cytokine in the inflammation of the dental pulp tissues, alterations in *IFN-γ* expression associated with the demethylation of the gene may influence the progression and development of the disease.

A few samples showed total methylation status, making clear association with density of inflammatory infiltrate difficult. Although total methylation of *IFN-γ* was observed in some samples of the control group, most of the samples in the case group exhibited partial methylation of this gene. This indicates 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. Because unmethylated sequence of gene is correlated with high messenger RNA levels of IFN-γ in mice mononuclear cells (27), the loss of DNA methylation in the dental pulp may represent a defense mechanism mediated by IFN-γ production. To test the hypothesis of epigenetic regulation of IFN-γ production, we evaluated the transcription of this gene according to the MSP status. Although the totally methylated samples showed no transcription of *IFN-γ,* messenger RNA levels of *IFN-γ* were only observed in the samples with partial methylation.

Our study suggests that inflammation in human dental pulp is characterized by a change from a totally methylated to a partial methylated status of the *IFN-γ* gene. This finding may explain the high prevalence of IFN-γ messenger RNA in inflamed pulps and a cell-mediated type-1 immune response in the initial stage of pulp inflammation (13).

The demethylation of DNA can occur by blocking methylation of newly synthesized DNA during replication (28) or because of unknown enzymatic factor with demethylase activity (29) and also because of an oxidative demethylation (30). Although the process involving demethylation is poorly known, *IFN-γ* promoter demethylation was reported in memory CD8 T cells after antigenic stimulation (27).

In conclusion, our study shows that inflammation in human dental pulp is associated with demethylation of the promoter region of the *IFN-γ* gene. Furthermore, our study showed that the methylation status is associated with the transcription of the gene. These findings suggest 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.

Acknowledgments

We thank Daniele Ramalho da Silva for technical assistance.

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;41:176–84.
3. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet 1998;19:187–91.
4. Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. 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;79:1514–9.
6. Sanders VM. Epigenetic regulation of Th1 and Th2 cell development. Brain Behav Immun 2006;20:317–24.
7. Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, et al. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastric, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. Am J Pathol 2003;163:1551–6.
8. Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. Rethinking periodontal inflammation. J Periodontol 2008;79:1577–84.
9. Kwon N-H, Kim J-S, Le J-Y, et al. DNA methylation and he expression of IL-4 and IFN-g promoter genes in patients with bronchial asthma. J Clin Immunol 2008;28:139–46.
10. White GP, Watt PM, Holt BJ, et al. 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;168:2820–7.
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;35:1687–93.
12. Doherty GM, Lange JR, Langstein HN, et al. 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;68:6785–9.
14. Goldenberg D, Harden S, Masayesva 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, et al. Different signaling pathways inhibit DNA methylation activity and up-regulate IFN-γ in human lymphocytes. J Leukoc Biol 2005;78:1339–46.
16. Brakensiek K, Langer F, Kreipe H, et al. Absence of p21(CIP1), p27(KIP1) and p57(KIP2) methylation in MDS and AML. Leuk Res 2005;29:1357–60.
17. Kwong J, Lo KW, Chow LS, et al. Silencing of the retinoid response gene TIG1 by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer 2005;113:386–92.
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;60:1249–53.
19. Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, et al. Levels of interferon- gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. J Periodontol 2009;80:290–6.
20. Livak KJ, Schimittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCt method. Methods 2001;25:402–8.
21. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. Aust Dent J 2007;52:S4–16.
22. McLachlan JL, Smith AJ, Bujalska IJ, et al. Gene expression profiling of pulpal tissue reveals the molecular complexity of dental caries. Biochim Biophys Acta 2005;1741:271–81.
23. Zehnder M, Delaleu N, Du Y, et al. Cytokine gene expression—part of host defence in pulpitis. Cytokine 2003;22:84–8.
24. Hahn C, Liewehr FR. Innate immune response of the dental pulp to caries. J Endod 2007;33:643–51.
25. Hahn C, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. J Endod 2007;33:213–9.
26. De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gamma, interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, bt not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. J Endod 2008;34:31–8.
27. 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. J Immunol 2006;176:4083–93.
28. Ooi S, Bestor T. The colorful history of active DNA demethylation. Cell 2008;133:1145–8.
29. Bruniquel D, Schwartz RH. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. Nat Immunol 2003;4:235–40.
30. Hamm S, Just G, Lacoste N, et al. On the mechanism of demethylation of 5-methylcytosine in DNA. Bioorg Med Chem Lett 2008;18:1046–9.

Methylation pattern of the *CD14* and *TLR2* genes in human dental pulp

Fabiano Pereira Cardoso[a], DDs, MSc; Simone Angélica de Faria Amormino[b], DDs, MSc; Walderez Ornelas Dutra[b] , PhD; Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho[a], DDs, MSc, PhD; Paula Rocha Moreira[b*], DDs, MSc, PhD

a. Department of Restorative Dentistry, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

b. Department of Morphology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

***** 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

Acknowledgments

None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript.

Abstract

Introduction: Pattern-recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptor 2 (TLR-2) and TLR-4, participate in the activation of immune cells by microorganisms when dental pulp is inflamed. However, the expression levels of PRRs can be modulated by epigenetic factors, especially DNA methylation. In this study, the methylation status of the TLR-2 and CD14 (TLR4 co-receptor) genes in healthy and inflamed human dental pulp were examined. **Methods:** The Methyl-Profiler DNA Methylation qPCR Assay was used to verify the DNA methylation patterns. **Results:** No differences in the methylation patterns were observed between the two groups. Most DNA was unmethylated in both groups. C**onclusion:** The hypomethylation of *TLR2* and *CD14* genes is a usual feature in human dental pulp.

Keywords: dental pulp, DNA methylation, CD14, TLR2

Introduction

Microbial invasion causes immune responses in pulp tissues that serve to eliminate microorganisms (1). Among the mechanisms that play a role in microbial detection and the subsequent activation of the immune system, pattern-recognition receptors (PRRs) are noteworthy. These receptors bind to bacterial components called pathogen-associated molecular patterns – PAMPs (2).

Evidence has shown that Toll-like receptor 2 (TLR2), a PRR, is involved in triggering the immune responses against Gram-positive bacteria (3). Toll-like receptor 4 (TLR4) is associated with the recognition and development of immune responses against lipopolysaccharides (LPS) present in the cell walls of Gram-negative bacteria (4). TLR4 acts together with CD14 to recognize LPS (5). Many studies have found an increase in the expression levels of TLR2 and CD14 in inflamed pulp tissues (6-8).

Gene expression can be influenced by a variety of factors, including epigenetic events. Although these events change DNA, they do not lead to modifications to the nucleotide sequence. DNA methylation is an epigenetic alteration that involves the addition of methyl groups to cytosines, typically cytosines located in CpG islands (9). The presence or absence of a methyl group on a cytosine can modulate gene expression. In general, methylated cytosines inhibit gene transcription (10).

Based on the fact that there are increases in the levels of TLR2 and CD14 expression after microbial invasion into pulp cells and that these expression levels may be influenced by epigenetic factors (4, 6), the aim of this study was to evaluate the methylation patterns of *TLR2* and *CD14* genes in pulp tissue recovered from decayed and healthy teeth.

Materials and Methods

Sample Collection

This study was approved by the local ethics committee for research (ETIC 390/08). Subjects were recruited at the Dentistry School of Universidade Federal de Minas Gerais, where all participants were treated and pulp tissues were collected. The control group was composed of 22 subjects, 14 females and 8 males, with an age ranging from 14 to 29 years. In the control group, the pulp tissue was collected after the surgical removal of impacted third molars. The case group was composed of 22 individuals, 17 females and 5 males, with an age ranging from 13 to 50 years. In this group, pulp tissues were collected from teeth exhibiting irreversible pulpitis. The samples were stored at -80°C, as described elsewhere (11).

DNA Extraction

Genomic DNA was extracted from samples with the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. The DNA was quantified using a Nanodrop Spectrophotometer (ND-1.000) and treated with 20 μl of RNAse.

Analysis of DNA Methylation

DNA methylation status of the promoter regions of the human *TLR2* and *CD14* genes was performed using the Methyl-Profiler DNA Methylation qPCR Assay (SABiosciences Corp. Frederick, MD) according to the manufacturer's instructions. In this assay, methylation-sensitive and methylation-dependent restriction enzymes were used to digest unmethylated and methylated DNA, respectively. Mock-digested (without enzyme) and double-enzyme samples were included in the assay. After the

reactions, the remaining DNA was quantified by real-time PCR using primers that flank the promoter region of the gene of interest. The relative concentrations of methylated and unmethylated DNA were determined comparing the amounts in the single, double, and mock digests. Real-time PCR was performed using the SYBR Green fluorescence quantification system (SABiosciences, Qiagen, Chatsworth, CA) in a CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA).

The data were analyzed using the Excel-based PCR array data analysis template from SABiosciences according to the manufacturer's instructions (SABiosciences, Qiagen, Chatsworth, CA). The Excel template normalizes the Ct values of both digests to that of the mock digestion to calculate the percentages of the DNA that are methylated and unmethylated.

The promoter regions of the *TLR2* (UniGene n.:Hs.519033; NCBI ID: 7097) and *CD14* (UniGene n.:Hs.163867; NCBI ID: 929) genes were evaluated in the present study. The location of the CpG island from *TLR2* gene is Chr4:154824536 – 154825502 and from *CD14* gene is Chr5:139991666 – 139992923.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a two-tailed Mann Whitney test in SPSS 17.0 statistical software (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, USA). A value of $p<0.05$ was considered statistically significant.

Results

An unmethylated profile in the *TLR2* and *CD14* genes was observed in both groups. The percentages of methylated and unmethylated DNA in the *TLR2* and *CD14* genes are

displayed in Figure 1 and 2, respectively. With regards to *TLR2* methylation status, the median of unmethylated DNA frequency was 99.24% in the control group, whereas in the case group was 99.03%. Considering the *CD14* gene, both groups showed a median of about 4% of methylated DNA. No significant differences were observed between the two groups with respect to the methylation patterns ($p>0.05$).

Discussion

Studies on epigenetics events in pulp tissue are in the initial stages. Pulp tissue is surrounded and protected by mineralized dentine and, thus, the conditions are favorable for investigating methylation-inflammation interactions. Recently, we reported the first study showing the association of inflammatory events with the changes in the methylation pattern (11).

Epigenetic factors regulate the expression of genes, interfering with physiological or pathological events (9). Several studies have found that the inflammatory response to a microbial challenge is associated with changes in the DNA methylation pattern (12-14). Our group observed differences in the IFN-γ methylation pattern when comparing healthy and inflamed human pulp. Additionally, an association between the pattern of IFN-γ methylation and its expression in this tissue was observed (11).

In this study, we analyzed CpGs in the promoter region of the *TLR2* gene, and we did not observe any difference in the methylation status among the groups. Recent study in human endothelial cells described no association between the *TLR2* methylation profile and gene expression (15). Conversely, low levels of DNA

methylation and high gene expression were detected for TLR-2 in cells from patients with cystic fibrosis compared with cells from healthy tissues (16).

TLR-4, along with the CD14 receptor, is associated with the recognition and development of immune responses against LPS. No difference in the *CD14* methylation pattern was observed between the two groups analyzed in our study. Recently, it was shown that the methylation pattern can influence the *CD14* gene regulation in the human placenta (17). In addition, it was reported that the higher levels of methylation are associated with lower soluble CD14 levels in blood clots from children (18). However, the distinct expression levels of CD14 in monocytes and dendritic cells were not related to the methylation pattern (19).

Although no difference in the methylation status of normal and inflamed dental pulp was observed in this study, changes in the expression levels of TLR2 and CD14 after microbial stimuli have been reported. *In vitro* studies have shown an increase in TLR-2 expression in odontoblasts stimulated with LPS (7), and CD14 expression was increased in odontoblast-like cells after LPS exposure (6). When the pulp chamber is open and the oral microbiota reaches the pulp tissue, a significant increase in the mRNA expression of TLR2 and TLR4 is observed (8). Since our results demonstrated the same methylation status in the study groups, further studies are needed to determine the mechanisms involved in expression of TLR2 and CD14 in the dental pulp. In conclusion, the present investigation shows evidence for the first time that an unmethylated profile in the *TLR2* and *CD14* genes is a usual feature in human dental pulp.

Acknowledgments

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors wish to thank the postgraduate program at the School of Dentistry of UFMG. FPC is a CAPES fellow; PRM, RSG, WOD and APRS are CNPq fellows. The authors deny any conflicts of interest.

References

1. Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. **J Endod** 2007;33:213-219.

2. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. **Biochem J** 2009;420:1-16.

3. Zähringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H, Alexander C. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. **Immunobiology** 2008;213:205-224.

4. Staquet MJ, Carrouel F, Keller JF, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, et al. Pattern-recognition receptors in pulp defense. **Adv Dent Res** 2011;23:296-301.

5. Tukhvatulin AI, Logunov DY, Shcherbinin DN, Shmarov MM, Naroditsky BS, Gudkov AV, et al. Toll-like receptors and their adapter molecules. **Biochemistry (Mosc)** 2010;75:1098-1114.

6. Botero TM, Shelburne CE, Holland GR, Hanks CT, Nör JE. TLR4 mediates LPS-induced VEGF expression in odontoblasts. **J Endod** 2006;32:951-955.

7. Durand SH, Flacher V, Roméas A, Carrouel F, Colomb E, Vincent C, et al. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing

dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. **J Immunol** 2006;176:2880-2887.

8. Mutoh N, Tani-Ishii N, Tsukinoki K, Chieda K, Watanabe K. Expression of toll-like receptor 2 and 4 in dental pulp. **J Endod** 2007;33:1183-1186.

9. Auclair G, Weber M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. **Biochimie** 2012;94:2202-2211.

10. Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. **Cell** 2002;108:475-487.

11. Cardoso FP, Viana MB, Sobrinho AP, Diniz MG, Brito JA, Gomes CC, et al. Methylation pattern of the IFN-gamma gene in human dental pulp. **J Endod** 2010;36:642-646.

12. Minárovits J. Microbe-induced epigenetic alterations in host cells: the coming era of patho-epigenetics of microbial infections. A review. **Acta Microbiol Immunol Hung** 2009;56:1-19.

13. Bayarsaihan D. Epigenetic mechanisms in inflammation. **J Dent Res** 2011; 90:9-17.

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

15. Diesel B, Ripoche N, Risch RT, Tierling S, Walter J, Kiemer AK. Inflammation-induced up-regulation of TLR2 expression in human endothelial cells is independent of differential methylation in the TLR2 promoter CpG island. **Innate Immun** 2012;18:112-123.

16. Shuto T, Furuta T, Oba M, Xu H, Li JD, Cheung J et al. Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased

proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. **FASEB J**. 2006;20:782-4.

17. Slaats GG, Reinius LE, Alm J, Kere J, Scheynius A, Joerink M. DNA methylation levels within the CD14 promoter region are lower in placentas of mothers living on a farm. **Allergy** 2012;67:895-903.

18. Munthe-Kaas MC, Torjussen TM, Gervin K, Lødrup Carlsen KC, Carlsen KH, Granum B, et al. CD14 polymorphisms and serum CD14 levels through childhood: a role for gene methylation? **J Allergy Clin Immunol** 2010;125:1361-1368.

19. Bullwinkel J, Lüdemann A, Debarry J, Singh PB. Epigenotype switching at the CD14 and CD209 genes during differentiation of human monocytes to dendritic cells. **Epigenetics** 2011;6:45-51.

Figure 1- Methylated and unmethylated DNA frequency of the *TLR2* gene in dental pulp tissues.

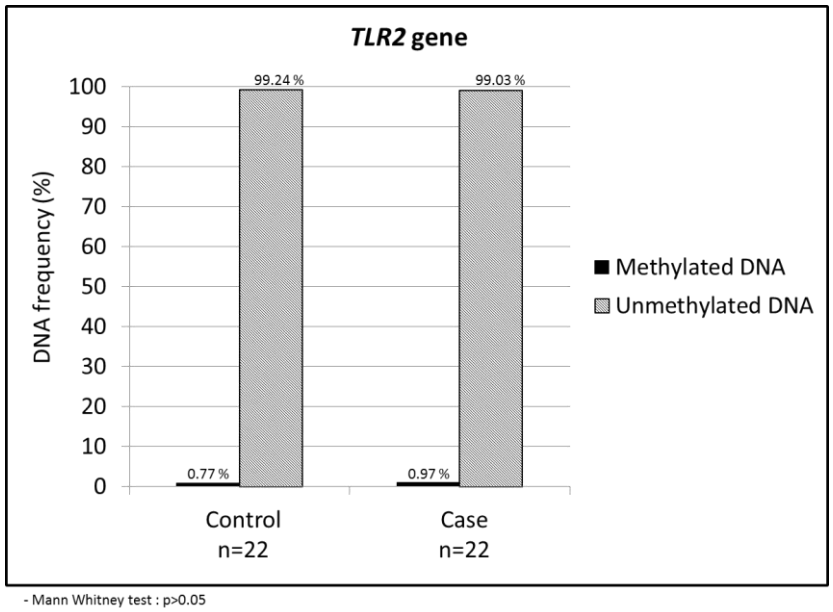
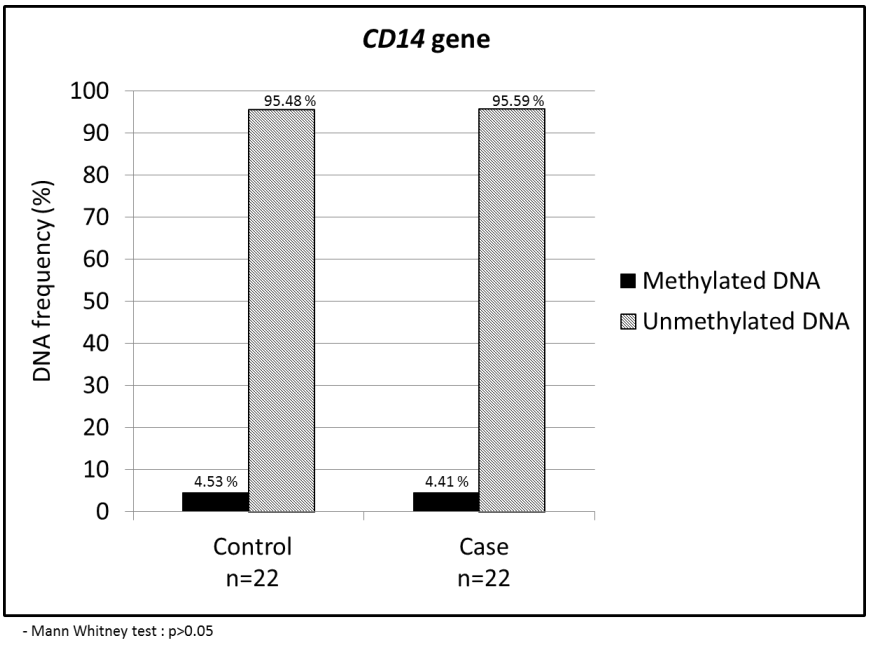


Figure 2- Methylated and unmethylated DNA frequency of the *CD14* gene in dental pulp tissues.



6- Conclusões

Nossos experimentos nos permitiram concluir:

- Há uma redução da metilação na região promotora do gene IFN-γ no tecido pulpar inflamado, quando comparado ao normal;
- A hipometilação de IFN-γ está associada a um aumento na expressão deste gene no tecido pulpar inflamado.
- A hipometilação nos genes TLR-2 e CD14 foi um evento comum no tecido pulpar com e sem inflamação.

7-Referências Bibliográficas

ADCOCK, I. M. et al. Epigenetic regulation of airway inflammation. **Curr Opin Immunol,** v. 19, n. 6, p. 694-700, Dec 2007.

ALBIGER, B. et al. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. **J Intern Med,** v. 261, n. 6, p. 511-28, Jun 2007.

AMORMINO, S. A. F. et al. Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. **Human Immunology**, 2013.

BASSET, C. et al. Innate immunity and pathogen-host interaction. **Vaccine,** v. 21 Suppl 2, p. S12-23, Jun 2003.

BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol,** v. 2 Suppl 1, p. S4-11, Dec 2005.

BERGENHOLTZ, G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. **J Endod,** v. 7, n. 3, p. 100-4, Mar 1981.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol Immunol,** v. 40, n. 12, p. 845-59, Feb 2004.

BILLIAU, A. Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects. **Cytokine Growth Factor Rev,** v. 17, n. 5, p. 381-409, Oct 2006.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Interferon-gamma: a historical perspective. **Cytokine Growth Factor Rev,** v. 20, n. 2, p. 97-113, Apr 2009.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev,** v. 16, n. 1, p. 6-21, Jan 2002.

BOTERO, T. M. et al. TLR4 mediates LPS-induced VEGF expression in odontoblasts. **J Endod,** v. 32, n. 10, p. 951-5, Oct 2006.

CARDOSO, F. P. et al. Methylation pattern of the IFN-gamma gene in human dental pulp. **J Endod,** v. 36, n. 4, p. 642-6, Apr 2010.

COHEN, S.; HARGREAVES, K. M. **Caminhos da Polpa**, 10ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 928

DIESEL, B. et al. Inflammation-induced up-regulation of TLR2 expression in human endothelial cells is independent of differential methylation in the TLR2 promoter CpG island. **Innate Immun,** v. 18, n. 1, p. 112-23, 2012.

DORMAN, S. E.; HOLLAND, S. M. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. **Cytokine Growth Factor Rev,** v. 11, n. 4, p. 321-33, Dec 2000.

DUTZAN, N. et al. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. **J Periodontol,** v. 80, n. 2, p. 290-6, Feb 2009.

EKSTRÖM, A. M. et al. Helicobacter pylori in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. **Gastroenterology,** v. 121, n. 4, p. 784-91, Oct 2001.

FARGES, J. C. et al. Odontoblasts in the dental pulp immune response. **J Exp Zool B Mol Dev Evol,** v. 312B, n. 5, p. 425-36, Jul 2009.

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

FRUCHT, D. M. et al. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends Immunol,** v. 22, n. 10, p. 556-60, Oct 2001.

HAHN, C. L.; BEST, A. M.; TEW, J. G. Cytokine induction by Streptococcus mutans and pulpal pathogenesis. **Infect Immun,** v. 68, n. 12, p. 6785-9, Dec 2000.

HAHN, C. L.; LIEWEHR, F. R. Innate immune responses of the dental pulp to caries. **J Endod,** v. 33, n. 6, p. 643-51, Jun 2007a.

HAHN, C. L.; LIEWEHR, F. R. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. **J Endod,** v. 33, n. 7, p. 773-81, Jul 2007b.

HAHN, M. A. et al. Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. **Cancer Res,** v. 68, n. 24, p. 10280-9, Dec 2008.

HIRAO, K. et al. Roles of TLR2, TLR4, NOD2, and NOD1 in pulp fibroblasts. **J Dent Res,** v. 88, n. 8, p. 762-7, Aug 2009.

JONES, P. A. Cancer. Death and methylation. **Nature,** v. 409, n. 6817, p. 141, 143-4, Jan 2001.

KANEKO, T. et al. Gene expression analysis of acutely traumatized pulps. **J Endod,** v. 36, n. 1, p. 78-82, Jan 2010.

KASS, S. U.; PRUSS, D.; WOLFFE, A. P. How does DNA methylation repress transcription? **Trends Genet,** v. 13, n. 11, p. 444-9, Nov 1997.

KERSH, E. N. et al. Rapid demethylation of the IFN-gamma gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. **J Immunol,** v. 176, n. 7, p. 4083-93, Apr 2006.

KIM, N. Y. et al. O-Methylation of flavonoids using DnrK based on molecular docking. **J Microbiol Biotechnol,** v. 17, n. 12, p. 1991-5, Dec 2007.

KIM, S. A.; LIM, S. S. T lymphocyte subpopulations and interleukin-2, interferon-gamma, and interleukin-4 in rat pulpitis experimentally induced by specific bacteria. **J Endod,** v. 28, n. 3, p. 202-5, Mar 2002.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition in the innate immune response. **Biochem J,** v. 420, n. 1, p. 1-16, May 2009.

LEVENSON, J. M.; SWEATT, J. D. Epigenetic mechanisms in memory formation. **Nat Rev Neurosci,** v. 6, n. 2, p. 108-18, Feb 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods,** v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA JR, J. F. **Endodontia: biologia e técnica.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011

LU, H. X. et al. Effect of IL-1ra on human dental pulp cells and pulpal inflammation. **Int Endod J,** v. 35, n. 10, p. 807-11, Oct 2002.

MAEKITA, T. et al. High levels of aberrant DNA methylation in Helicobacter pylori-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. **Clin Cancer Res,** v. 12, n. 3 Pt 1, p. 989-95, Feb 2006.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature,** v. 449, n. 7164, p. 819-26, Oct 2007.

NARAYANAN, L. L.; VAISHNAVI, C. Endodontic microbiology. **J Conserv Dent,** v. 13, n. 4, p. 233-9, Oct 2010.

NETEA, M. G. et al. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? **Trends Immunol,** v. 24, n. 5, p. 254-8, May 2003.

O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **Immunity,** v. 8, n. 3, p. 275-83, Mar 1998.

RICHARDSON, B. DNA methylation and autoimmune disease. **Clin Immunol,** v. 109, n. 1, p. 72-9, Oct 2003.

SALNIKOW, K.; COSTA, M. Epigenetic mechanisms of nickel carcinogenesis. **J Environ Pathol Toxicol Oncol,** v. 19, n. 3, p. 307-18, 2000.

SANTOS, K. F.; MAZZOLA, T. N.; CARVALHO, H. F. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. **Braz J Med Biol Res,** v. 38, n. 10, p. 1531-41, Oct 2005.

SHIAO, Y. H. et al. Allele-specific germ cell epimutation in the spacer promoter of the 45S ribosomal RNA gene after Cr(III) exposure. **Toxicol Appl Pharmacol,** v. 205, n. 3, p. 290-6, Jun 2005.

SHUTO, T. et al. Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. **FASEB J,** v. 20, n. 6, p. 782-4, Apr 2006.

STAQUET, M. J. et al. Pattern-recognition receptors in pulp defense. **Adv Dent Res,** v. 23, n. 3, p. 296-301, Jul 2011.

SÁNCHEZ-PERNAUTE, O. et al. Epigenetic clues to rheumatoid arthritis. **J Autoimmun,** v. 30, n. 1-2, p. 12-20, 2008 Feb-Mar 2008.

TAKIGUCHI, M. et al. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. **Exp Cell Res,** v. 286, n. 2, p. 355-65, Jun 2003.

TAO, L. et al. Effect of trichloroethylene and its metabolites, dichloroacetic acid and trichloroacetic acid, on the methylation and expression of c-Jun and c-Myc protooncogenes in mouse liver: prevention by methionine. **Toxicol Sci,** v. 54, n. 2, p. 399-407, Apr 2000.

TOSI, M. F. Innate immune responses to infection. **J Allergy Clin Immunol,** v. 116, n. 2, p. 241-9; quiz 250, Aug 2005.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat Rev Immunol,** v. 7, n. 3, p. 179-90, Mar 2007.

TUKHVATULIN, A. I. et al. Toll-like receptors and their adapter molecules. **Biochemistry (Mosc),** v. 75, n. 9, p. 1098-114, Sep 2010.

VERCELLI, D. Genetics, epigenetics, and the environment: switching, buffering, releasing. **J Allergy Clin Immunol,** v. 113, n. 3, p. 381-6; quiz 387, Mar 2004.

VON DER WEID, T. et al. 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,** v. 157, n. 10, p. 4421-7, Nov 1996.

WILSON, A. G. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. **J Periodontol,** v. 79, n. 8 Suppl, p. 1514-9, Aug 2008.

YU, C.; ABBOTT, P. V. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. **Aust Dent J,** v. 52, n. 1 Suppl, p. S4-16, Mar 2007.

ZÄHRINGER, U. et al. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. **Immunobiology,** v. 213, n. 3-4, p. 205-24, 2008.

Anexo I

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-*y* 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

Av. Pres. Antonio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II - 2º andar – Sala 2005 – Cep:31270-901 – BH-MG
Telefax: (031) 3409-4592 - e-mail: coep@prpq.ufmg.br

Anexo II

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ASSOCIAÇÃO ENTRE O PADRÃO DE METILAÇÃO E A EXPRESSÃO GÉNICA DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS 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: interleucina-10 (IL-10), o interferon-gama (IFN-γ), *toll like receptor 2* (TLR-2) e CD14. A produção dessas moléculas é influenciada pela estrutura do DNA, que contém 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-10, IFN-γ, TLR-2 e CD14 e sua transcrição em RNAm, 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 20 pacientes que necessitem de tratamento endodôntico e 20 pacientes que necessitem da remoção do terceiro molar incluso. O tecido que fica dentro do dente desses pacientes será submetido a analise para avaliar se existe diferença na estrutura do DNA e produção de RNAm, 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 confidencialidade 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 Doutorado 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