



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ENDODONTIA**

CAROLINE WICHNIESKI

**METILAÇÃO DO DNA E MICRO RNAS: MECANISMOS
DE REGULAÇÃO GÊNICA QUE INTERFEREM NA
PROGRESSÃO DE LESÕES PERIAPICAIS**

**Curitiba
2017**

CAROLINE WICHNIESKI

**METILAÇÃO DO DNA E MICRO RNAS: MECANISMOS
DE REGULAÇÃO GÊNICA QUE INTERFEREM NA
PROGRESSÃO DE LESÕES PERIAPICAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Everdan Carneiro.

Curitiba

2017

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

W635m Wichnieski, Caroline
2017 Metilação do DNA e micro RNAS : mecanismos de regulação gênica que
interferem na progressão de lesões periápicais / Caroline Wichnieski ;
orientador, Everdan Carneiro. -- 2017
62 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2017.
Inclui bibliografias

1. Odontologia. 2. MicroRNAS. 3. Metilação de DNA. 4. Doenças periapicais.
5. Genes. I. Carneiro, Everdan. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.6

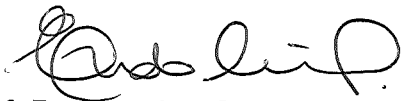
TERMO DE APROVAÇÃO

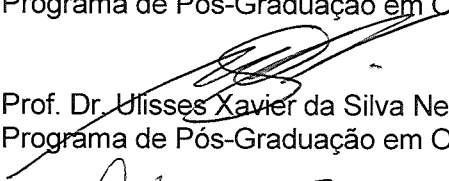
CAROLINE WICHNIESKI

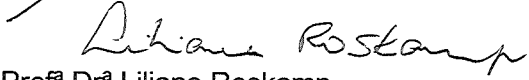
METILAÇÃO DO DNA E MICRO RNAS: MECANISMOS DE REGULAÇÃO GÊNICA QUE INTERFEREM NA PROGRESSÃO DE LESÕES PERIAPICAIS

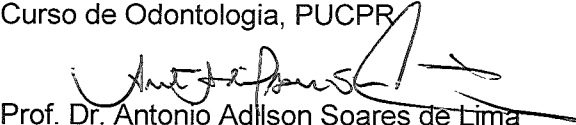
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Endodontia**.

Orientador (a):


Prof. Dr. Everdan Carneiro
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Ulisses Xavier da Silva Neto
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Profª Drª Liliane Roskamp
Curso de Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR


Prof. Dr. Renato Menezes da Silva
Programa de Pós-Graduação da University of Texas, UTHEALH

Curitiba, 07 de agosto de 2017.

“Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários.”

C.S Lewis

Agradecimentos

Aos meus pais, **Dirceu Wichnieski** e **Tania Wichnieski**, responsáveis por meu caráter e educação. Obrigada pela força, incentivo e por me acalmarem quando a vontade de desistir batia. Vocês são minha fortaleza e inspiração. Tudo que faço me espelho na dedicação, força de vontade e superação de vocês. Vocês são exemplos de vida para mim. Amo vocês.

A minha irmã, **Cristiane Wichnieski**, pelas horas de desabafo, pelo colo carinhoso e pelo incentivo. Obrigada por estar sempre presente em minha vida; por tornar a dor mais tênue e a felicidade mais intensa. Nada seria sem você! Te amo.

A minha amiga e irmã de coração, **Isabel Zanata**, por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida. Obrigada pelo carinho, pelos conselhos e por sempre me motivar durante os anos de doutorado. Você é um exemplo para mim pessoal e profissionalmente. Te amo.

Agradeço a minha **família** e **amigos** por tornarem a distância menor no tempo que fiquei fora do país. Obrigada pelas palavras de incentivo e as orações de cada um! Não teria conseguido sem vocês.

Ao meu namorado **Marcelo Pettersen Delay**, que mesmo em pouco tempo de convivência sempre me incentivou e me apoiou. Obrigada pelas broncas nos dias em que pensei desistir. Obrigada por sempre confiar em mim e me lembrar diariamente o quanto sou capaz de realizar meus sonhos. Você é incrível, te amo.

Sou muito grata ao meu orientador **Everdan Carneiro** por todos os anos de convivência que tivemos. Obrigada por sempre me guiar e incentivar. Obrigada pelas palavras de conforto e pelas conversas sinceras. Se não fosse por seu incentivo, não teria tido coragem de me desafiar em um Doutorado Sanduíche. Graças a você consegui realizar meu sonho. Obrigada pela confiança sempre em meu potencial e meu trabalho. Muito obrigada por todo conhecimento e aprendizado que tive com você. Palavras não são suficientes para agradecer tudo que você sempre fez por mim. Você sempre será um exemplo de profissional para mim. Muito obrigada.

Aos meus coorientadores **Renato Menezes Silva** e **Ariadne Letra** que me receberam em seu laboratório de portas abertas. Nunca irei esquecer a experiência que tive em laboratório e pesquisa com vocês. Obrigada por me receberem e me tratarem como um membro da família, sem nunca terem me conhecido antes. Obrigada por toda experiência que tive, o contato que me permitiram ter com várias metodologias diferentes, que eu nunca teria tido a oportunidade de conhecer se não estivesse estado aí com vocês! Com certeza levarei tudo isto para a minha vida! Muito obrigada!

Agradeço também, a minha colega de laboratório **Talita Tartari** pela amizade neste tempo que convivemos em Houston. Obrigada pela companhia e pelas risadas nos dias difíceis. Você foi o conforto e a companhia que me deixaram sempre perto do Brasil. Obrigada por confiar em mim e por me deixar participar de seus experimentos e por sempre me ajudar nos meus. Aprendemos muito trabalhando juntas neste tempo. Nunca serei capaz de agradecer o suficiente por tudo que me ensinou neste tempo que passamos juntas! Admiro seu entusiasmo, profissionalismo e amor pela pesquisa e sua profissão.

Aos Professores do programa de doutorado **Profa. Dra. Vania Portela Ditzel Westphalen**, **Prof. Dr. Ulisses Xavier da Silva Neto** e **Prof. Dr. Luis Fernando Fariniuk**, pela convivência e imensa contribuição na minha formação. Com certeza são grandes profissionais e sempre me espelhei em vocês. Vocês tem grande crédito em tudo que sei e me tornei.

A minha colega de doutorado, **Alessandra Timponi Cruz**, pela maravilhosa convivência e amizade nesses anos, desde o mestrado. Sou muito grata pela parceria que construímos e por sua confiança em meu trabalho sempre. Te admiro muito pessoal e profissionalmente. Obrigada pelas oportunidades que me deu de trabalhar e produzir cientificamente juntamente com você. Aprendi muito com você, e com certeza teve grande influência em minha formação. Serei sempre grata a tudo que fez e faz por mim. Muito obrigada.

Ao meu colega de doutorado **Alexandre Kowalczuck** pelas trocas de experiências e inúmeros ensinamentos. Admiro muito seu trabalho, seu profissionalismo e seu caráter.

Ao professor **Gustavo Pompermeier Garlet** pela parceria realizada e por ter contribuído com o trabalho realizando a parte de expressão gênica.

Ao **CNPQ** pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche através do programa Ciências sem Fronteiras. Com certeza foi um diferencial em minha formação.

A ***American Association of Endodontists*** por financiar esta pesquisa.

Aos alunos tutorados, pelas lições aprendidas, pela convivência, e pelo carinho para comigo.

A todos aqueles, que de algum modo, colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ARTIGO 1 - VERSÃO EM PORTUGUÊS.....	2
Página Título.....	2
Resumo.....	3
Introdução.....	4
Material e Métodos.....	5
Resultados.....	8
Discussão.....	9
Conclusão.....	11
Referências.....	11
Anexos.....	13
Anexo I - Metodologia: Metilação do DNA.....	13
Anexo II - Metodologia: Extração do RNA, obtenção do cDNA e Expressão Gênica.....	15
Anexo III - Parecer do Comitê de Ética.....	18
ARTIGO 1 - VERSÃO EM INGLÊS	199
Title page.....	199
Abstract.....	20
Introduction	21
Material and Methods.....	21
Results	23
Discussion.....	24
Conclusion	24
References.....	24
ARTIGO 2 - VERSÃO EM PORTUGUÊS.....	27
Página título	27
Resumo.....	28
Introdução.....	30
Material e Método	31
Resultados	34
Discussão	36
Conclusão	39
Referências.....	39
Anexos.....	42

Anexo I - Metodologia: IlluminaSeq.....	42
Anexo II - Metodologia: Predição de possíveis novos miRNAs.....	43
Anexo III - Lista de siglas e abreviaturas.....	44
Anexo IV - <i>Heatmaps</i>	46
Anexo V - Parecer do Comitê de Ética.....	48
ARTIGO 2 - VERSÃO EM INGLÊS	49
Title page.....	50
Abstract	50
Introduction	51
Material and Methods.....	52
Results	54
Discussion.....	57
Conclusion	59
References.....	60

RESUMO

Introdução: A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos que as células utilizam para reprimir a transcrição genética sem alterar a sequência do DNA. MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de fita simples de RNA que regulam a expressão gênica por meio de uma sequência específica. Nossa hipótese é de que a metilação do DNA e os miRNAs afetam a resposta de genes relacionados com a resposta imune, o que pode contribuir para o desenvolvimento de lesões periapicais. **Material e Métodos:** Os níveis de metilação de 20 genes relacionados com a resposta imuno-inflamatória foram avaliados em 49 lesões por meio da reação de cadeia polimerase (PCR) de uma matriz específica. A expressão gênica de 60 lesões e 24 controles (ligamento periodontal) foi realizada para a validação deste estudo. O sequenciamento de nova geração foi realizado em 9 lesões periapicais (5 assintomáticas e 4 sintomáticas) e 2 controles utilizando o Illumina HiSeq. Os dados foram analisados, o teste de Mann Whitney foi aplicado e o Fold-change (FC) dos miRNAs foi calculado. Os valores $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. **Resultados:** Os genes *CXCL3* (77%) e *FADD* (89%) mostraram-se hipermetilados em lesões periapicais quando comparados com controles. Por outro lado, os genes *IL12B* (22%) e *IL4R* (25%) apresentaram-se hipometilados. A expressão gênica mostrou que a expressão dos quatro genes foi inversamente proporcional aos níveis de metilação encontrados ($p=0,001$). Mais de 800 miRNAs mostraram-se expressos nas amostras. O miRNA hsa-miR-10a-5p mostrou-se altamente expresso em lesões periapicais (FC 8.44) quando comparado com controles. O miRNA has-miR-218-5p mostrou-se altamente expresso em casos sintomáticos (FC 1.93). Os miRNAs que se mostraram altamente expressos estão correlacionados com as vias de ação da diferenciação de osteoclastos e fator de necrose tumoral (*TNF*), enquanto os pouco expressos estão correlacionados com as vias de *AMPK* e receptores de célula B ($p<0.05$). **Conclusão:** A metilação do DNA e os miRNAs possuem um papel importante na modulação da expressão gênica em lesões periapicais.

Palavras-chave: miRNA, metilação do DNA, lesões periapicais

ARTIGO 1 - VERSÃO EM PORTUGUÊS

Página título

Níveis de metilação do DNA dos genes *IL12B*, *IL4R*, *CXCL3* e *FADD* influenciam na expressão de mRNA e podem interferir no desenvolvimento e progressão de granulomas periapicais

Agradecimentos

Os autores negam conflitos de interesse.

Os autores agradecem os participantes do estudo.

Esta pesquisa recebeu suporte financeiro da American Association of Endodontists Foundation Research Grants para VO e RMS.

CNPq pelo consentimento da bolsa de Doutorado Sanduíche.

Resumo

Objetivo: Determinar os níveis de metilação de 20 genes envolvidos na resposta autoimune e inflamatória em granulomas periapicais. **Material e Métodos:** O DNA total de 109 granulomas foram extraídos: para a análise da metilação do DNA das células foram utilizadas 3 concentrações de 11, 13 e 12 granulomas cada e 13 granulomas individuais. O PCR em tempo real (qPCR) foi realizado na *ViiA7 Sequence Detection Instrument* (Life Technologies, Carlsbad, CA). Os níveis de metilação de 22 genes envolvidos na resposta inflamatória e autoimune foram avaliados utilizando o *Epitect Methyl II Human Inflammatory Response & Autoimmunity DNA Methylation PCR Array* (SABiosciences, Qiagen, Chatsworth, CA). Os dados foram analisados por meio do *Epitect Methyl Gene*. Após, a expressão gênica foi realizada. **Resultados:** Os resultados da metilação do DNA obtidos foram analisados utilizando o *software SABiosciences hierarchical clustering and methylation*. Os genes *FADD* (89%) e *CXCL3* (77%) mostraram-se hipermetilados, enquanto os genes *IL12B* (22%) e *IL4R* (25%) mostram-se hipometilados em granulomas. Na análise de expressão gênica, *CXCL3*, *IL12B*, *IL4R* e *FADD* mostraram diferente expressão em lesões quando comparados com controles ($p=0,0001$). A expressão observada foi inversamente proporcional aos níveis de metilação desses genes. **Conclusão:** A metilação do DNA parece exercer um papel importante na modulação da expressão gênica e pode interferir na progressão de lesões periapicais.

Palavras-chave: granulomas periapicais, metilação do DNA, inflamação.

Introdução

Granulomas periapicais (GP) se desenvolvem ocorrem decorrente da migração de microorganismos e seus produtos oriundos do canal radicular para a área periapical, resultando em reabsorção óssea. (1) A presença de microorganismos no tecido periapical desencadeia a liberação de inúmeros mediadores pró e antiinflamatórios que podem contribuir tanto para a progressão como para o processo de cura dos granulomas periapicais. (2)

O desenvolvimento da lesão inclui uma complexa rede de sinalização e uma complexa cascata de eventos, em níveis celulares e epigenéticos, que irão determinar o destino da lesão. Esses eventos são regulados por diferentes células, fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas e alguns fatores epigenéticos. (3)

As modificações epigenéticas são importantes para o funcionamento celular adequado, desde a regulação de genes essenciais e de genes associados a proteínas, até a inativação daqueles que não se fazem necessários (4). Por outro lado, modificações epigenéticas podem causar alterações nas funções genéticas, o que pode ajudar no desenvolvimento de doenças inflamatórias. Os mecanismos epigenéticos são três: a metilação do DNA, as alterações em histonas e os microRNAs.

A metilação do DNA é considerado o maior modificador epigenético em genomas mamíferos (4) e é definido pela incorporação de um grupo metil DNA O resultado desta incorporação é uma modulação genética transcricional – genes hipermetilados irão causar uma diminuição na expressão gênica, enquanto genes hipometilados irão causar um aumento na transcrição. (5)

Estudos anteriores mostraram que a metilação do DNA é responsável pela regulação dos mecanismo de ação de alguns genes de algumas citocinas como o interferon-gamma (*IFNG*) (6) e a proteína *FOX P3* (*FOXP3*) (7) em lesões periapicais. Até o presente momento não foram encontrados estudos correlacionando a metilação de DNA com outros genes relacionados com o processo inflamatório e autoimune em granulomas periapicais .

O objetivo deste estudo foi investigar os padrões de metilação do DNA de 20 genes envolvidos na resposta inflamatória e autoimune em granulomas periapicais.

Material e Método

Seleção da amostra

Este estudo foi aprovado pelo *Committee for Protection of Human Subjects at the University of Texas Health Science Center at Houston* (HSC-DB-12-0280; Número de Referência: 110003). Os participantes incluídos neste estudo apresentavam lesões periapicais, caracterizadas radiograficamente como lesões radiolúcidas sem limites definidos da cortical óssea alveolar. Os dentes não deveriam ter passado por tratamento endodôntico prévio, ter respondido negativamente ao teste de vitalidade e sido indicados para extração. O diagnóstico clínico foi determinado por endodontista utilizando os critérios da *American Association of Endodontists* (AAE). Pacientes apresentando doenças sistêmicas ou realizando o uso de medicamentos sistêmicos que interferissem no metabolismo ósseo, ou de uso contínuo (ex: antibióticos sistêmicos, anti-inflamatórios, terapia hormonal) até 6 meses antes do início do estudo, pacientes com doença periodontal ou grávidas não foram incluídos neste estudo.

Os dentes foram extraídos na Clínica de Urgência da *University of Texas*, as lesões foram coletadas com auxílio de curetas periodontais e divididas em dois fragmentos iguais: um fragmento foi armazenado em formalina 10% para processamento histológico, e o outro em *Tissue Tek solution* (Sakura Finetek Inc, Torrance, CA) para a futura extração do DNA genômico. As amostras armazenadas em formalina foram submetidas ao processo histológico de rotina (fixados em formalina, incluídos em parafina e corados com Hematoxilina e Eosina) e seccionados para a análise histopatológica. Granulomas foram definidos histopatologicamente como tecidos contendo capilares, células inflamatórias, fibras colágenas e macrófagos, e a ausência de camada epitelial.

Metilação do DNA

Para a análise da metilação foram utilizados 13 granulomas individuais e 3 concentrações com 11, 12 e 13 granulomas cada, totalizando 16 amostras. As amostras foram coletadas, divididas em dois fragmentos iguais e armazenadas em

Isolamento do DNA

O DNA foi extraído de amostras devidamente armazenadas utilizando o kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen Inc., Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O tecido foi digerido e preparado para a análise da metilação utilizando o kit *Epiect Methyl DNA Restriction* (Qiagen Inc., Valencia, CA) também de acordo com as instruções do fabricante. O método utilizado pelo Sistema *Epiect Methyl II PCR* é baseado na detecção do DNA remanescente após a clivagem com uma enzima de restrição metilação-sensitiva e/ou metilação-dependente. (8) Essas enzimas agem digerindo o DNA não metilado e metilado respectivamente. Após a digestão, o DNA remanescente de cada reação individual da enzima foi quantificado por meio do PCR de tempo real utilizando *primers* que pareiam com a região promotora de interesse. As frações relativas de DNA metilado e não metilado são determinados subsequentemente por meio da comparação da quantidade digerida com um “modelo” (sem adição da enzima) utilizando o método do ΔC_t . (9).

Análise da metilação do DNA

O DNA digerido foi utilizado para a análise dos níveis de metilação de 20 genes envolvidos na resposta inflamatória e autoimune (*CCL25*, *CXCL14*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL6*, *IL12A*, *IL12B*, *IL17C*, *IL10RA*, *IL12B*, *IL13RA1*, *IL15*, *IL17RA*, *IL4R*, *IL6R*, *IL6ST*, *FADD*, *GATA3*, *IL13*, *IL7*, *TYK2*) utilizando a matriz *Epiect Methyl II Human Inflammatory Response & Autoimmunity DNA Methylation PCR*: EAHS-521Z (SABiosciences, Qiagen, Chatsworth, CA). Esta matriz é um prato de 96 poços pré-fabricados que contém os *primers* de todos os genes que serão analisados.

Para a análise da metilação do DNA, 16 amostras foram utilizadas. As reações foram realizadas em um volume final de 20 μ L na *ViiA7 Sequence Detection Instrument* (Life Technologies, Carlsbad, CA). Os experimentos foram realizados em duplicata. Os resultados foram determinados e analisados por meio do *Epiect Methyl Gene*, e os níveis de metilação foram determinados.

A análise dos níveis de metilação do DNA foi realizada utilizando o *software SABiosciences's hierarchical clustering and methylation* e expressas em

porcentagem. Os genes que possuísssem uma porcentagem de metilação igual ou inferior a 25% e igual ou superior a 75% foram selecionados para a realização da expressão gênica.

Expressão gênica

Para a análise da expressão gênica foram utilizados 60 granulomas como grupo caso e 24 ligamentos periodontais (LP) como grupo controle. As amostras do grupo controle foram obtidas de terceiros molares hígidos de pacientes jovens que estavam indicados para a extração.

Genes com níveis de metilação iguais ou menores que 25% (*IL12B* e *IL4R*) e iguais ou maiores que 75% (*CXCL3* e *FAAD*) foram selecionados para a realização da expressão gênica (Gráfico 1). O RNA total de 60 granulomas e 24 ligamentos periodontais foram utilizados para a mensuração da expressão do mRNA utilizando *TaqMan chemistry* (Invitrogen, Carlsbad, CA) por meio da reação em cadeia polimerase em tempo real (qPCR). Os tecidos foram digeridos e homogeneizados com o uso do TRIZOL (Life Technologies, Grand Island, NY) em “*lysing beads tubes*” na FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Santa Aa, California, USA) de acordo com instruções dos fabricantes. O RNA total foi extraído das amostras utilizando o kit *miRNeasy* (Qiagen Inc., Valencia, CA) de acordo com instruções do fabricante.

A integridade do RNA das amostras foi verificada por meio da análise de 1µg do RNA total utilizando *Nano Drop 1000* (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA.). Após, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando-se 3 µg do RNA através de PCR utilizando o kit *Super Script III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Reações foram realizadas em um prato de 96 poços com um volume final de 20 µL utilizando *Taqman mRNA expression assays* (Invitrogen, Carlsbad, CA) por meio de *ViiA7 Sequence Detection Instrument*. Os *primers* utilizados foram: *IL12B* (Hs01011518_m1), *IL4R* (Hs00965056_m1), *CXCL3* (Hs00171061_m1), *FAAD* (Hs00538709_m1) e *Beta-actina* (Hs01086757_m1) foi utilizada como controle endógeno para normalização dos genes. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Análise estatística da expressão gênica

Os resultados foram tabulados e o *software GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) foi utilizado para a análise estatística. Os resultados foram expressos em média, mediana e desvio padrão e o teste de Mann Whitney foi utilizado para comparação entre os grupos controle e experimental; os valores $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

Por meio da expressão gênica realizada com o *Epitect Methyl Gene*, foi possível detectar o nível de metilação de 20 genes relacionados com a resposta imuno-inflamatória. Os níveis de metilação encontrados podem ser observados no Gráfico 1. Os genes que obtiveram os níveis de metilação igual ou menores que 25% (*IL12B* 22% e *IL4R* 25%) e maiores ou iguais à 75% (*CXCL3* 77% e *FADD* 89%) foram selecionados para a realização da expressão gênica.

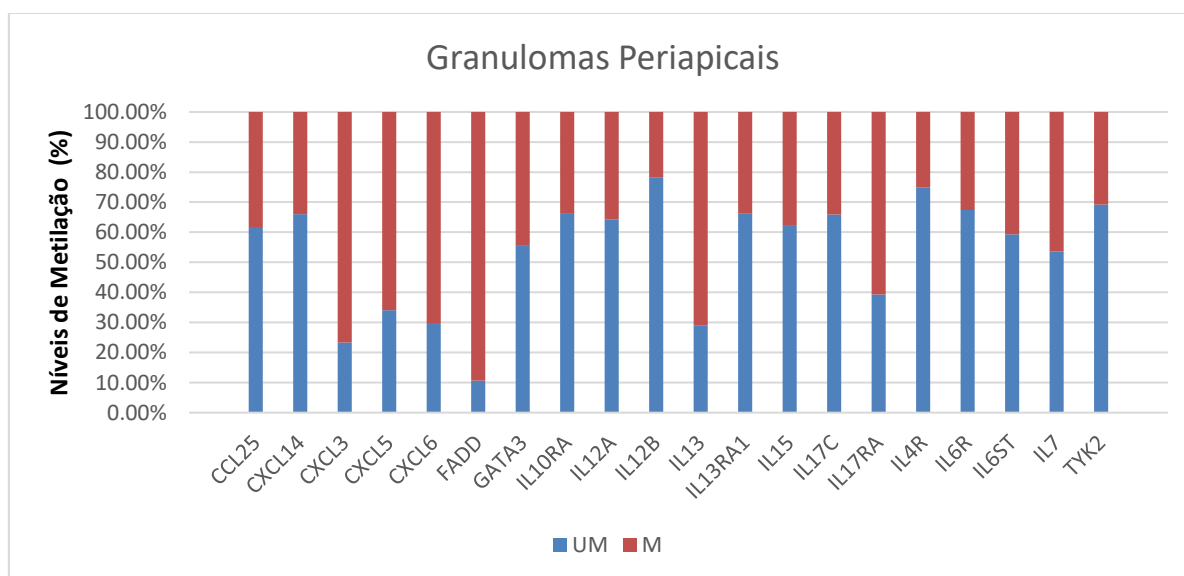


Gráfico 1: Níveis de metilação de 20 genes relacionados com a resposta inflamatória e autoimune em granulomas periapicais. (UM = não metilado – M = metilado).

A análise da expressão gênica mostrou que os genes *IL12B* e *IL4R*, que foram hipometilados, foram diferentemente expressos em lesões quando comparados com controle ($p=0,0001$). Além disso, a expressão observada foi inversamente proporcional aos níveis de metilação encontrados. O mesmo foi

observado com a expressão dos genes *CXCL3* e *FADD*, que foram hipermetilados e apresentaram uma expressão gênica menor em lesões quando comparado com controles ($p=0,0001$) (Figura 1).

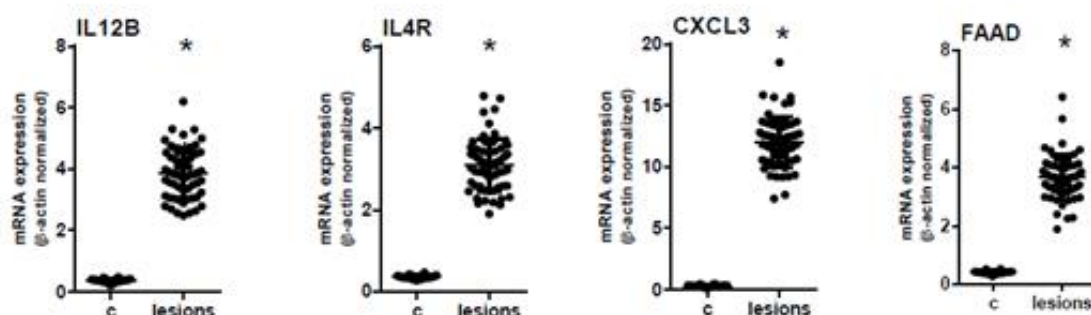


Figura 1 – Gráficos apresentando a diferente expressão gênica dos genes em lesões quando comparados com controles. (*) Representa diferença estatística significante.

As médias, medianas e o desvio padrão das amostras dos grupos controle e lesões, assim como os valores p encontrados na análise estatística estão dispostos na Tabela 1.

Genes	Média		Desvio Padrão		Mediana		Mann Whitney
	lesão	controle	lesão	controle	lesão	controle	
IL12B	3,22	0,36	1,15	0,05	3,09	0,35	0,0001
IL4R	3,86	0,36	0,81	0,07	3,83	0,37	0,0001
CXCL3	12,00	0,29	0,29	0,08	12,06	0,28	0,0001
FADD	3,66	0,41	0,41	0,05	3,66	0,41	0,0001

Tabela 1 – Análise da expressão gênica. Média, Desvio Padrão e Mediana das amostras de lesões e controles. Valores p resultantes da comparação entre lesões e controles.

Discussão

A expressão de vários mediadores inflamatórios são programados por meio de mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA. (10-12)

A relação entre a expressão genética e a metilação é complexa. A metilação do DNA tem um papel importante na regulação da expressão genética. Em geral, a metilação do DNA reprime a transcrição genética, enquanto a não metilação é

associada com a ativação de genes. (4, 13) Mudanças nos níveis de metilação e, consequentemente, na expressão genética podem levar ao desenvolvimento ou a manutenção de doenças autoimunes e inflamatórias. (14)

Estudos prévios mostraram diferentes níveis de metilação de Matriz Metaloproteinase 9 (*MMP9*), *Forkhead box P3 (FoxP3)* e Interferon gama (*INFG*) em lesões periapicais. (5-7) No entanto, até o momento não foram encontrados estudos relacionando estes níveis em outros genes relacionados com a inflamação e a imunidade.

A metilação de 20 genes relacionados com a inflamação e a imunidade foram avaliados em nosso estudo. Genes que possuíram os maiores e os menores níveis de metilação foram submetidos a análise da expressão gênica para validação do estudo. Os genes *IL12B* e *IL4R* mostraram-se hipometilados enquanto os genes *CXCL3* e *FAAD* hipermetilados em granulomas periapicais.

Interleucina 12 subunidade β (*IL12B*) é um indutor do desenvolvimento de células Th1. Ela é ativada por macrófagos e parece sustentar o número de células Th1 que mediam a proteção do organismo frente a presença de patógenos intracelulares. Uma vez que este gene está hipometilado pode-se esperar uma grande presença dessas citocinas nessas lesões, sustentando e mantendo a inflamação crônica.(15)

O gene do receptor do interleucina 4 (*IL4R*) também foi hipometilado em lesões quando comparado com controles. Essa citocina, que está envolvida no processo inflamatório, eleva a proliferação de Th2, está relacionado com doenças atópicas crônicas como asma, rinite alérgica, sinusite (16) e também vem sendo relacionada com a patogênese da periodontite. (17)

O gene *CXCL3* atua na inflamação como um quimiotático para neutrófilos (18), que são a primeira linha de defesa celular, mais abundantes em inflamações agudas. Uma vez que granulomas representam uma inflamação crônica seria esperado um número pequeno destas células nestas lesões.

O gene *FADD* é reconhecido por sua função no processo de apoptose celular. (19) Este gene também parece atuar em outros processos como a proliferação e regulação do ciclo celular. (20) A expressão de *FADD* em lesões periapicais foi pequena, corroborando a análise da metilação, uma vez que este gene se mostrou hipermetilado em granulomas. A expressão do gene *FADD* nos

controles também foi baixa. A baixa expressão em controles também era esperada, uma vez que os tecidos utilizados como controles foram tecidos saudáveis.

Conclusão

Os genes *FADD* e *CXCL3* mostraram-se hipermetilados enquanto os genes *IL12B* e *IL4R* mostraram-se hipometilados. A expressão gênica de *IL12B* e *IL4R* se mostrou inversamente proporcional aos seus níveis de metilação.

Mecanismos epigenéticos indicam ter uma importante função na modulação da expressão gênica e no processo de cura de granulomas periapicais.

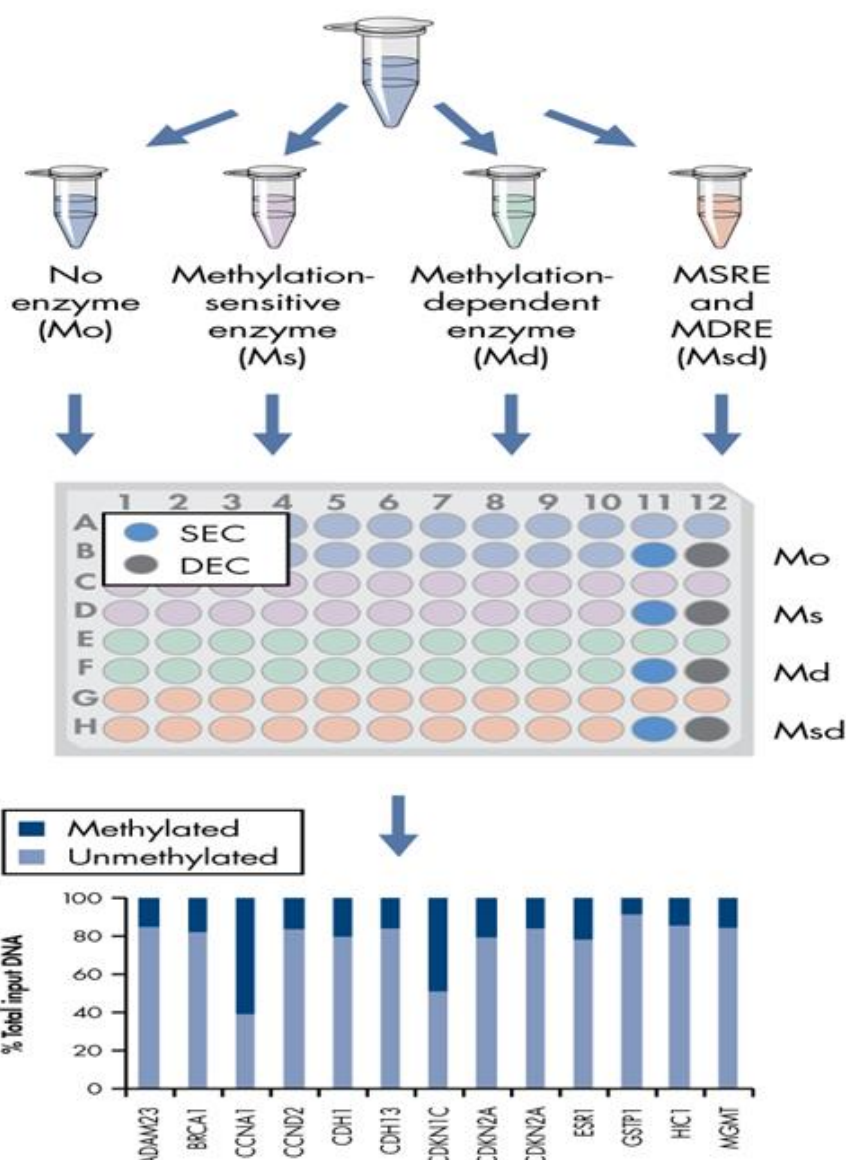
Referências

1. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1965;20(3):340-349.
2. Nair P. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *International endodontic journal* 2006;39(4):249-281.
3. Heo SC, Jeon ES, Lee IH, Kim HS, Kim MB, Kim JH. Tumor necrosis factor- α -activated human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing through paracrine mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 2011;131(7):1559-1567.
4. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang L-H, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic acids research* 1982;10(8):2709-2721.
5. Campos K, Gomes CC, Farias LC, Silva RM, Letra A, Gomez RS. DNA methylation of MMP9 is associated with high levels of MMP-9 messenger RNA in periapical inflammatory lesions. *Journal of endodontics* 2016;42(1):127-130.
6. Campos K, Gomes CC, de Fátima Correia-Silva J, Farias LC, Fonseca-Silva T, Bernardes VF, et al. Methylation pattern of IFNG in periapical granulomas and radicular cysts. *Journal of endodontics* 2013;39(4):493-496.
7. Campos K, Franscisoni CF, Okechie V, de Souza LC, Trombone APF, Letra A, et al. FOXP3 DNA methylation levels as a potential biomarker in the development of periapical lesions. *Journal of endodontics* 2015;41(2):212-218.
8. Ordway J, Bedell J, Citek R, Nunberg A, Garrido A, Kendall R, et al. Comprehensive DNA methylation profiling in a human cancer genome identifies novel epigenetic targets. *Carcinogenesis* 2006;27(12):2409-2423.
9. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods* 2001;25(4):402-408.
10. Armenante F, Merola M, Furia A, Palmieri M. Repression of the IL-6 gene is associated with hypermethylation. *Biochemical and biophysical research communications* 1999;258(3):644-647.
11. Nile CJ, Read RC, Akil M, Duff GW, Wilson AG. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2008;58(9):2686-2693.

12. Baccarelli A, Rusconi F, Bollati V, Catelan D, Accetta G, Hou L, et al. Nasal cell DNA methylation, inflammation, lung function and wheezing in children with asthma. 2012.
13. Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell* 1988;53(1):3-4.
14. Ari G, Cherukuri S, Namasivayam A. Epigenetics and Periodontitis: A Contemporary Review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 2016;10(11):ZE07.
15. Thornhill M, Wellicome S, Mahiouz D, Lanchbury J, Kyan-Aung U, Haskard D. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and-independent binding mechanisms. *The Journal of Immunology* 1991;146(2):592-598.
16. Jia X-W, Yuan Y-D, Yao Z-X, Wu C-J, Chen X, Chen X-H, et al. Association between IL-4 and IL-4R Polymorphisms and Periodontitis: A Meta-Analysis. *Disease markers* 2017;2017.
17. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome biology* 2006;7(12):243.
18. Kim P, Dutra AS, Chandrasekharappa SC, Puck JM. Genomic structure and mapping of human FADD, an intracellular mediator of lymphocyte apoptosis. *The Journal of Immunology* 1996;157(12):5461-5466.
19. Alappat EC, Feig C, Boyerinas B, Volkland J, Samuels M, Murmann AE, et al. Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKI α regulates its nonapoptotic activities. *Molecular cell* 2005;19(3):321-332.

Anexos

Anexo I- Metodologia: Metilação do DNA



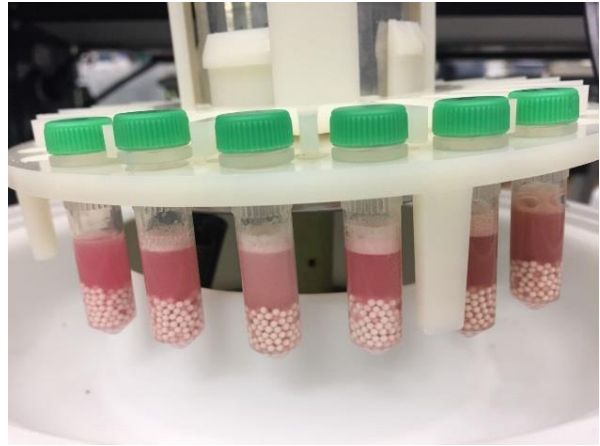
O DNA total das amostras foi extraído utilizando o kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen Inc., Valencia, CA). O kit *Epitect Methyl DNA Restriction* (Qiagen Inc., Valencia, CA) foi utilizado como *master mix* para a preparação das soluções. A placa *Epitect Methyl II Human Inflammatory Response & Autoimmunity DNA Methylation* PCR: EAHS-521Z (SABiosciences, Qiagen, Chatsworth, CA) foi utilizada para a análise das amostras em qPCR. Esta placa possui 96 poços, é pré-fabricada e já contém todos os genes que serão analisados assim como os controles. Os volumes finais das reações foram de 20µl. O qPCR foi realizado em ViiA7. Os níveis de metilação de cada gene foi determinado através do *software*

SABiosciences's hierarchical clustering and methylation. Gráficos de colunas foram realizados com os resultados obtidos para melhor visualização dos mesmos.

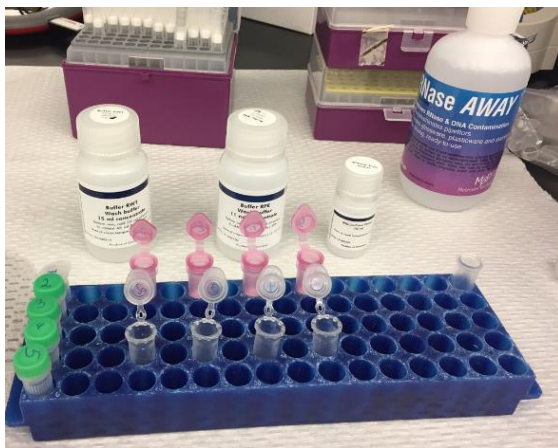
Anexo II – Metodologia: Extração do RNA, obtenção do cDNA e Expressão Gênica



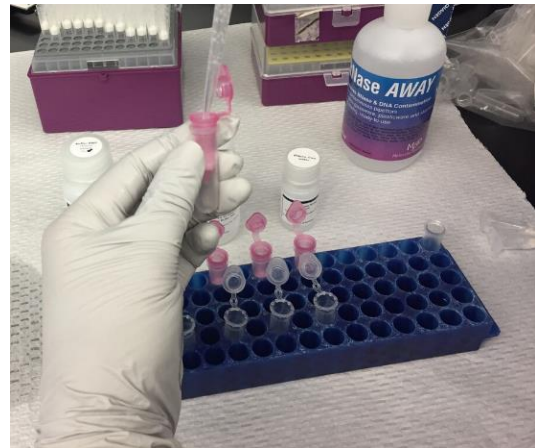
1-Amostras sendo lisadas no homogeneizador FastPrep-24.



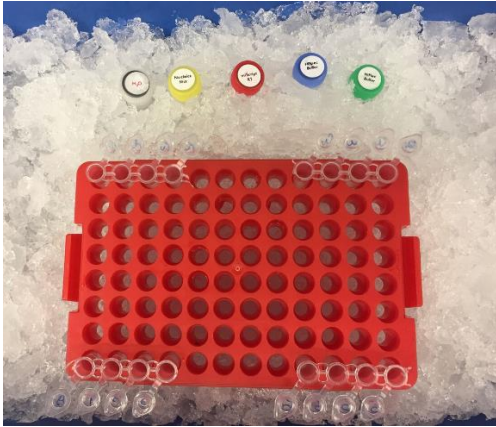
2- Amostras lisadas e Homogeinizadas.



3- Extração do RNA com o kit *miRNeasy*.



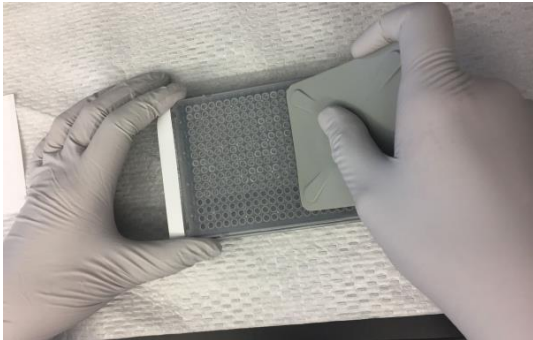
4- Uso de *spin columns* para a purificação do RNA.



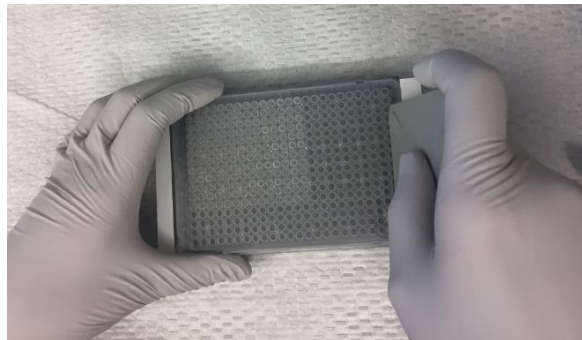
5- Obtenção do cDNA (DNA complementar).



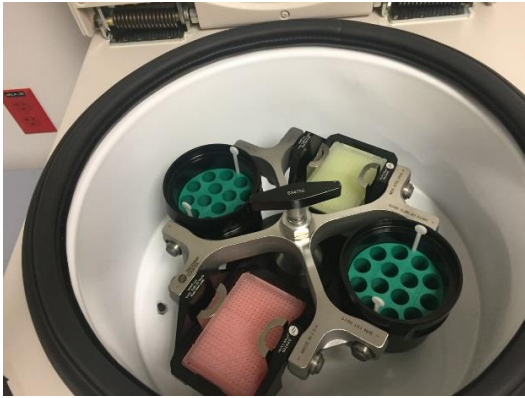
6- Preparo da placa de 96 poços para a expressão genética.



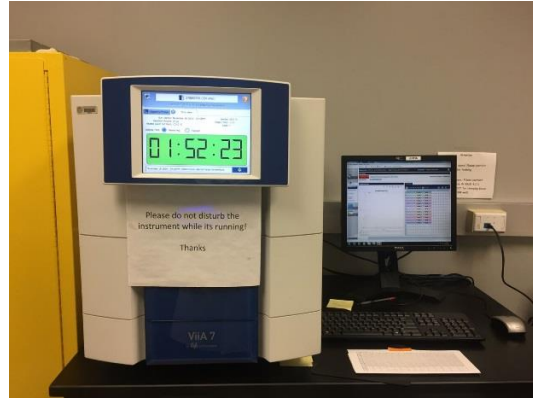
7- Vedamento da placa com filme.



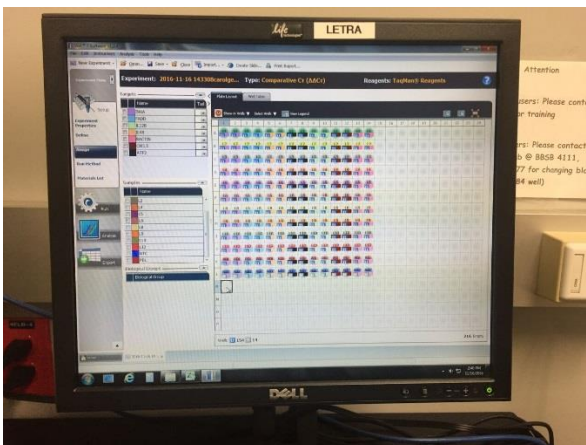
8- Vedamento lateral da placa.



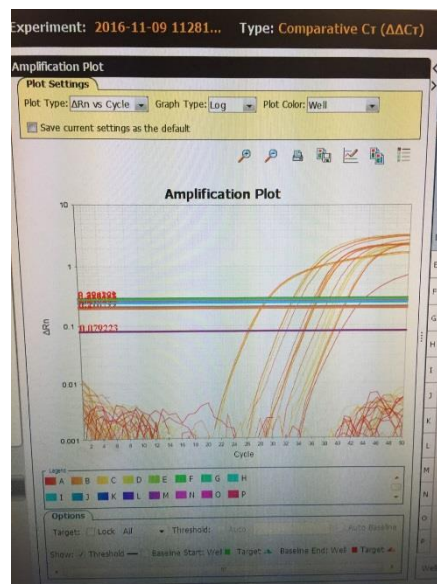
9-Centrifugação da placa.



10- ViiA 7: Equipamento utilizado para realizar o qPCR. Ele é acoplado a uma computador e através do programa é possível observar a amplificação dos genes em tempo real



11- Setagem do programa para a expressão gênica.



12- Amplificação dos *primers*.

Anexo III – Parecer do comitê de Ética



Committee for the Protection of Human Subjects

6410 Fannin Street, Suite 1100
Houston, Texas 77030

NOTICE OF APPROVAL TO IMPLEMENT REQUESTED CHANGES

February 22, 2017

HSC-DB-12-0280 - Genetic susceptibility to periodontal and periapical disease AND The Role of Heat shock proteins in Periapical disease AND Genetic predisposition to non-healing response in persistent apical periodontitis: the role of matrix metalloproteinases and cytokine gene polymorphisms AND MMP-7 and TIMP-1, new targets in predicting poor wound healing in apical periodontitis AND Characterization of immune regulatory and inflammatory cells in human periapical lesions AND DNA methylation levels as a potential biomarker in the development of periapical lesions AND Identifying Key Targets for Apical Periodontitis Development and Progression AND miRNA-Regulated Cytokines in Apical Periodontitis AND Investigating a potential correlation between endodontic pathologies and cardiovascular diseases AND Single nucleotide polymorphisms in β -catenin destruction complex genes: potential role in apical periodontitis development
PI: Dr. Renato Silva

Reference Number: 148155

PROVISIONS: Unless otherwise noted, this approval relates to the research to be conducted under the above referenced title and/or to any associated materials considered at this meeting, e.g. study documents, informed consent, etc.

APPROVED: By Expedited Review and Approval

CHANGE APPROVED: Addition of Title: Single nucleotide polymorphisms in β -catenin destruction complex genes: potential role in apical periodontitis development
Addition of Co-Investigators: Ahmad Reza Noroozi & Zegar Zegar
Single nucleotide polymorphisms in β -catenin destruction complex genes: potential role in apical periodontitis development - new consent - new title Version 1.1

REVIEW DATE: 02/01/2017

APPROVAL DATE: 02/22/2017

CHAIRPERSON: Charles C. Miller, III, PhD

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'C. Miller III'.

Upon receipt of this letter, and subject to any provisions noted above, you may now implement the changes approved.

Title page

***CXCL3, IL12B, IL4R* and *FADD* DNA methylation levels influence mRNA expression and may interfere with periapical granulomas development and progression**

Acknowledgments

The authors deny any conflicts of interest

The authors are thankful to the study participants

This work was supported by the American Association of Endodontists Foundation Research Grants to VO and RMS.

CNPq for financing the scholarship.

Abstract

Introduction: Variations in the methylation profile have been correlated to apical periodontitis progression. The aim of this study was to determine the methylation levels of 20 genes involved in immune-inflammatory response in periapical granulomas. **Material and Methods:** The DNA methylation patterns of 20 gene promoters involved in inflammation and autoimmunity were evaluated in 49 human periapical granulomas (HPG) using a pathway-specific real-time polymerase chain reaction array (EpiTect Methyl II; Qiagen Inc, Valencia, CA). Messenger RNA expression analysis by qualitative polymerase chain reaction was also performed in 60 HPG and 24 healthy periodontal ligament (controls) samples. SABiosciences's hierarchical clustering and methylation (Qiagen, Valencia, CA) and Prism6 software (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA) were used for data analysis. **Results:** DNA hypermethylation was observed in the promoters of the genes *CXCL3* (77%) and *FADD* (89%) while hypomethylation was observed in *IL12B* (22%) and *IL4R* (25%) genes. *IL12B*, *IL4R*, *CXCL3*, and *FADD* showed different mRNA expression in HPG and controls, which were inversely proportional to their methylation levels. **Conclusion:** DNA methylation seems to play an important role in modulating gene expression and may interfere with periapical granulomas progression.

Key words: periapical granulomas, DNA methylation, inflammation

Introduction

Periapical granulomas are the result of the migration of microorganisms from the infected root canal to the periapical area leading to bone resorption. (1) The presence of microorganisms in the periapical environment trigger the release of innumerable pro and anti-inflammatories mediators that can contribute for both the progression and the wound healing of the lesion. (2)

The lesion development include a complex signaling network and a complex cascade of events, in cellular and epigenetics levels, that will determinate the lesion outcome. These events are regulated by different cells, growth factors, chemiokynes, cytokynes and some epigenetic factors.(3)

Epigenetic modifications are important in the normal functioning of the cell, from regulating dynamic expression of essential genes and associated proteins to repressing those that are unneeded (4). In contrast, epigenetic modifications could also result in alterations in functional gene networks that lead to inflammatory disease. DNA methylation, histone modifications and non-coding RNA are three epigenetic mechanisms.

DNA methylation is considered the major epigenetic modification in mammalian genomes (4) and is defined as the incorporation of a methyl group in the messenger RNA. The result of this incorporation is a transcriptional genetic modulation – hypermethylated genes will result in the decrease of gene expression while hypomethylation genes leads to a transcriptional upregulation. (5)

Previous studies showed the involvement of DNA methylation as a regulatory mechanism of some cytokynes genes as interferon-gamma (*IFNG*) (6) and forkhead box P3 (*FOXP3*) (7) in periapical lesions. There is no studies correlating the DNA methylation of other inflammatory or autoimmune genes in granulomas.

The purpose of this study was to investigate the DNA methylation patterns of genes involved in inflammatory response and autoimmunity in apical granulomas.

Material and Methods

DNA Methylation

This study was approved by the Committee for Protection of Human Subjects at the University of Texas Health Science Center at Houston (HSC-DB-12-0280;

Reference Number: 110003). Subjects were patients presenting with apical periodontitis, characterized radiographically as radiolucent lesions showing absence of the periodontal ligament space and discontinuity of the lamina dura. All samples were obtained from teeth without endodontic treatment and referred for tooth extraction. Patients with medical conditions requiring the use of systemic modifiers of bone metabolism or other assisted drug therapy (i.e., systemic antibiotics, anti-inflammatory, hormonal therapy) during the last 6 months before initiation of the study, patients with preexisting conditions such as periodontal disease, and pregnant or lactating women were excluded from the study.

Samples were collected and divided into two similar fragments and stored in formalin and Tissue Tek solution (Sakura Finetek Inc, Torrance, CA) for further genomic DNA extraction. Samples stored in formalin were submitted to routine histologic processing (formalin-fixed paraffin-embedded tissues) and sectioned for histopathologic analyses. Granulomas were defined by the presence of capillaries, inflammatory cells, fibroblasts, collagen and macrophages, and absence of an epithelial lining.

For DNA methylation analyses 49 HPG were selected. First, 3 pools of HPG were used (n= 11, 13 and 12). After that, 13 granulomas were individually used for validation purposes.

For mRNA expression analysis 60 periapical lesions were used and 24 healthy periodontal dental ligament (PDL) samples were used as controls. Control samples were obtained from third molars and premolars referred to tooth extraction for orthodontic reasons.

Isolation and restriction digestion of tissue DNA

Genomic DNA was extracted from frozen tissue samples using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) according to the manufacturer's protocol. The tissue DNA extracts were digested and prepared for methylation analysis using Epiect Methyl DNA Restriction Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) according to the manufacturer's protocol. The method employed by the Epiect Methyl II PCR System is based on the detection of remaining input DNA after cleavage with a methylation-sensitive and/or a methylation-dependent restriction enzyme (8). These enzymes digest unmethylated and methylated DNA,

respectively. Following digestion, the remaining DNA in each individual enzyme reaction is quantified by real-time PCR using primers that flank a promoter region of interest. The relative fractions of methylated and unmethylated DNA are subsequently determined by comparing the amount in each digest with a 'mock' (no enzyme added) digest using the ΔC_t method (9).

DNA methylation analysis

The digested DNA samples were used as templates for the analysis of the methylation profile of 20 genes involved in inflammatory response and autoimmunity (*CCL25*, *CXCL14*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL6*, *IL12A*, *IL12B*, *IL17C*, *IL10RA*, *IL12B*, *IL13RA1*, *IL15*, *IL17RA*, *IL4R*, *IL6R*, *IL6ST*, , *FADD*, *GATA3*, *IL13*, *IL7* and *TYK2*) using the Epiect Methyl II Human Inflammatory Response & Autoimmunity DNA Methylation PCR Array: EAHS-521Z (SABiosciences, Qiagen, Chatsworth, CA). For the initial analysis, 3 pools of 11, 12 and 13 periapical granulomas DNA samples each were used as templates. For validation experiments, DNA from 60 individual granulomas was used as templates. Reactions were performed in 20 μ L final volume in a ViiA7 Sequence Detection Instrument (Life Technologies, Carlsbad, CA). Experiments were performed in duplicate. Data output representing DNA methylation levels were determined and analyzed using the Epiect Methyl Gene expression analyses.

Statistical Analysis

Experimental results were expressed as mean $\pm$ standard error (SE). Statistical analyses were performed using SABiosciences's hierarchical clustering and methylation and GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). One-way Anova test were used for statistical analysis of all the experiments to determine the differences between groups P-values ≤ 0.05 will be considered statistically significant.

Results

With the use of the Epiect Methyl Gene expression analyses it was possible to analyze the methylation levels of the 20 genes related with inflammation and

autoimmunity. The methylation levels of all genes are shown in Graph 1. Genes with methylation levels higher than 75% (*CXCL3* 77% and *FADD* 89%) and equal or lower than 25% (*IL12B* 22% and *IL4R* 25%) were selected for gene expression analyses.

The gene expression analyses showed that the hypomethylated genes, *IL12B* and *IL4R*, were differently expressed in lesions when compared to controls. Thus, this expression were inversely proportional to their methylation levels. The same pattern was observed with *CXCL3* and *FADD*, that were hypermethylated and shown a low expression in the gene expression analysis. (Figure 1)

Average, median, standard deviation and P values are shown on Table 1.

Discussion

It has been proposed that expression of several inflammatory mediators are programmed through epigenetic mechanisms, such as DNA methylation (10-12).

The relationship between methylation and gene expression is complex. DNA methylation plays an essential role in the regulation of gene expression. In general, DNA methylation represses gene transcription, and loss of methylation is associated with gene activation (4, 13). Changes in the methylation levels and consequently in gene expression can lead to the development and maintenance autoimmune or inflammatory diseases.(14)

Previous research have shown different levels of methylation of *MMP9*, *FoxP3* and *IFNG* in periapical lesions (5-7), but there is no study showing this levels in other inflammatory and immune related genes.

The methylation levels of 20 inflammatory and autoimmune genes were evaluated in our study. Genes with higher and lower methylation levels were submitted to gene expression evaluation for validation. Hypomethylated genes were *IL12B* and *IL4R* while *CXCL3* and *FAAD* were hypermetilated in periapical granulomas.

Interleukin 12 subunit B (*IL12B*) is an inducer of Th1 cells development. It is activated by macrophages and seen to sustain a sufficient number of Th1 cells to mediate long-term protection to intracellular pathogens. Once this gene is hypomethylated we have a lot of this cytokine present in the lesions, maintaining the chronic inflammation.

Interleukin-4 receptor (*IL4R*) was also hypomethylated in our study. This cytokine is involved in the process of inflammation, enhance Th2 cell proliferation, suppress Th1 cell proliferation, and downregulate Th1-mediated immune response. (17) It it's also related with chronic atopy diseases as allergic rhinitis, sinusitis, asthma (16) and is also closely related to the pathogenesis of periodontitis. (17)

CXCL3 plays a role in inflammation and as a chemoattractant for neutrophils (18), which are the first line of defense cells, most abundant in acute inflammation. Once granulomas are a chronic inflammation, we expect to have a small number of these cells.

FADD is well known for its role in apoptosis process. (19) It also seen to play a role in other processes including proliferation, cell cycle regulation and development. (20) The expression of *FADD* in periapical lesions were very low what validate our study, once that gene were hypermetilated, what represses its expression. The expression of *FADD* in the controls were low too, what was expected because the controls are healthy tissues.

Conclusion

In our study, we found two hypermethylated genes (*FADD* and *CXCL3*) that are related to migration and adhesion of monocytes and cell apoptosis, while the hypomethylated genes (*IL12B* and *IL4R*) act by regulating the immune response, activating macrophages and inducing Th1 an Th2 cells differentiation.

Epigenetic mechanisms may have a role in in modulating gene expression and the wound healing process in periapical granulomas.

References

1. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1965;20(3):340-349.
2. Nair P. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *International endodontic journal* 2006;39(4):249-281.
3. Heo SC, Jeon ES, Lee IH, Kim HS, Kim MB, Kim JH. Tumor necrosis factor- α -activated human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing through paracrine mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 2011;131(7):1559-1567.
4. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang L-H, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic acids research* 1982;10(8):2709-2721.

5. Campos K, Gomes CC, Farias LC, Silva RM, Letra A, Gomez RS. DNA methylation of MMP9 is associated with high levels of MMP-9 messenger RNA in periapical inflammatory lesions. *Journal of endodontics* 2016;42(1):127-130.
6. Campos K, Gomes CC, de Fátima Correia-Silva J, Farias LC, Fonseca-Silva T, Bernardes VF, et al. Methylation pattern of IFNG in periapical granulomas and radicular cysts. *Journal of endodontics* 2013;39(4):493-496.
7. Campos K, Franscisoni CF, Okechie V, de Souza LC, Trombone APF, Letra A, et al. FOXP3 DNA methylation levels as a potential biomarker in the development of periapical lesions. *Journal of endodontics* 2015;41(2):212-218.
8. Ordway J, Bedell J, Citek R, Nunberg A, Garrido A, Kendall R, et al. Comprehensive DNA methylation profiling in a human cancer genome identifies novel epigenetic targets. *Carcinogenesis* 2006;27(12):2409-2423.
9. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods* 2001;25(4):402-408.
10. Armenante F, Merola M, Furia A, Palmieri M. Repression of the IL-6 gene is associated with hypermethylation. *Biochemical and biophysical research communications* 1999;258(3):644-647.
11. Nile CJ, Read RC, Akil M, Duff GW, Wilson AG. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2008;58(9):2686-2693.
12. Baccarelli A, Rusconi F, Bollati V, Catelan D, Accetta G, Hou L, et al. Nasal cell DNA methylation, inflammation, lung function and wheezing in children with asthma. 2012.
13. Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell* 1988;53(1):3-4.
14. Ari G, Cherukuri S, Namasivayam A. Epigenetics and Periodontitis: A Contemporary Review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 2016;10(11):ZE07.
15. Jia X-W, Yuan Y-D, Yao Z-X, Wu C-J, Chen X, Chen X-H, et al. Association between IL-4 and IL-4R Polymorphisms and Periodontitis: A Meta-Analysis. *Disease markers* 2017;2017.
16. Thornhill M, Wellicome S, Mahiouz D, Lanchbury J, Kyan-Aung U, Haskard D. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and-independent binding mechanisms. *The Journal of Immunology* 1991;146(2):592-598.
17. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome biology* 2006;7(12):243.
18. Kim P, Dutra AS, Chandrasekharappa SC, Puck JM. Genomic structure and mapping of human FADD, an intracellular mediator of lymphocyte apoptosis. *The Journal of Immunology* 1996;157(12):5461-5466.
19. Alappat EC, Feig C, Boyerinas B, Volkland J, Samuels M, Murmann AE, et al. Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKI α regulates its nonapoptotic activities. *Molecular cell* 2005;19(3):321-332.

ARTIGO 2 - VERSÃO EM PORTUGUÊS

Página título

Sequenciamento de Nova Geração de miRNA identifica alta expressão de hsa-miR-10^a-5p em lesões peripicais e hsa-miR-218-5p como marcador em lesões sintomáticas.

Agradecimentos

Os autores negam conflitos de interesse.

Os autores agradecem os participantes do estudo.

Esta pesquisa recebeu suporte financeiro da *American Association of Endodontists Foundation Research Grants* para CW e RMS.

CNPq pelo consentimento da bolsa de Doutorado Sanduíche.

Resumo

Introdução: MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA que controlam a expressão gênica por meio do silenciamento de genes. Nossa hipótese é que os efeitos dos miRNAs em genes relacionados com a resposta imune podem contribuir para a dinâmica de desenvolvimento de periodontites apicais. **Material e Métodos:** O RNA total de nove lesões periapicais (quatro sintomáticas e cinco assintomáticas) e dois ligamentos periodontais (controles) foram extraídos de dentes indicados para extração dentária, e utilizados para a preparação da biblioteca de miRNA. O sequenciamento dos miRNAs foi realizado utilizando o *Illumina HiSeq2000*. Comparações entre miRNAs altamente e pouco expressos foram realizados e comparações entre lesões periapicais e controles; e lesões assintomáticas e sintomáticas foram testadas (*Fold Change* - FC). A análise das vias de ação foi realizada por meio do *software Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEDGG). **Resultados:** Mais de 800 miRNAs foram expressos em lesões periapicais e ligamento periodontal. O miRNA hsa-miR-10a-5p foi altamente expresso em periodontites periapicais (FC 8.44) quando comparado com controles. O miRNA has-miR-218-5p foi altamente expresso em casos sintomáticos (FC 1.93). Os miRNAs que foram altamente expressos estão correlacionados com as vias de ação da diferenciação de osteoclastos e fator de necrose tumoral (*TNF*), enquanto os pouco expressos estão correlacionados com as vias de *AMPK* e receptores de células B ($p < 0.05$). **Conclusão:** MicroRNAs aparentam ter um papel importante na modulação da expressão gênica interferindo no processo de cura em periodontite apical. O miRNA hsa-miR-218-5p pode ser um alvo importante a ser explorado em casos de lesões apicais sintomáticas.

Palavras-chave: miRNA, RNA, lesões periapicais, sequenciamento genético

Introdução

A periodontite apical (PA) representa uma resposta imunológica à progressão de microorganismos oriundos do espaço do canal radicular para os tecidos periapicais (1). Inflamação e reabsorção óssea podem ocorrer como uma consequência da interação entre a infecção microbiana e a resposta do hospedeiro. (21) Durante a resposta inflamatória um grande número de células residentes nos tecidos periapicais secretam citocinas, quimiocinas, leucotrienos e prostaglandinas. Estes mediadores inflamatórios reforçam o recrutamento de polimorfonucleares (PMNs) e leucócitos para a área afetada. (21)

De acordo com os sintomas clínicos, as lesões periapicais podem ser classificadas em sintomáticas e assintomáticas. (22) Os produtos bacterianos parecem influenciar os sintomas e o tamanho da lesão. (23) Atualmente tem-se tentado desvendar as variantes etiológicas e as funções biológicas que podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da periodontite apical.

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas não codificadoras de RNA que são potencialmente complementares a RNAs mensageiros (mRNA), interferindo na expressão gênica (24, 25) e se mostrando importantes reguladores de processos biológicos, diferenciação e proliferação celular, apoptose (25) e, mais recentemente, doenças inflamatórias. (25-27)

A importância da ação de miRNAs na regulação e alteração da resposta imune tem sido demonstrada. (28-32) Na Odontologia o papel dos miRNAs também tem sido estudado, eles foram encontrados na saliva e são considerados importantes no desenvolvimento de câncer bucal e modulação óssea em doenças periodontais. (32, 33) Na endodontia, um estudo identificou que alguns miRNAs são diferentemente expressos em polpas humanas saudáveis e inflamadas. (34)

O Sequenciamento de Nova Geração (SNG) surgiu como uma nova e promissora ferramenta que vem sendo aplicada para o monitoramento dos níveis de transcrição do genoma (m-RNA-seq). (35) Esta ferramenta é utilizada para sequenciamentos precisos de larga escala. O SNG foi utilizado para determinar os miRNAs diferentemente expressos nas periodontites apicais e para a predição de possíveis novos miRNAs em lesões sintomáticas e assintomáticas.

Parece ser evidente que os miRNAs possuem uma função importante na modulação do sistema imunológico, entretanto, sua eficiência na modulação da resposta inflamatória e imunológica em periodontites apicais ainda não foi

explorado. Nossa hipótese é de que a presença de miRNAs em genes relacionados com a resposta imunológica pode contribuir na dinâmica do desenvolvimento de periodontite periapicais.

Material e Método

Seleção das Amostras

Este estudo foi aprovado pelo *Committee for Protection of Human Subjects at the University of Texas Health Science Center at Houston* (HSC-DB-12-0280). Os participantes incluídos neste estudo apresentavam periodontites periapicais, caracterizadas radiograficamente como imagens radiolúcidas com limites mal ou bem definidos. Os dentes selecionados não deveriam ter passado por tratamento endodôntico prévio, ter respondido negativamente ao teste de sensibilidade pulpar e ter sido previamente indicados para a extração. Pacientes apresentando doenças sistêmicas ou realizando o uso de medicamentos sistêmicos que interferissem no metabolismo ósseo, ou de uso contínuo (antibióticos sistêmicos, anti-inflamatórios, terapia hormonal) até 6 meses antes do início do estudo, pacientes com doença periodontal e grávidas não foram incluídos neste estudo.

Dentes e tecidos periapicais foram coletados na Clínica de Urgência da Escola de Odontologia na Universidade do Texas. Para este estudo foram incluídas 5 lesões assintomáticas e 4 sintomáticas. O diagnóstico clínico foi baseado nos critérios da *American Association of Endodontists* (AAE) e foi determinado por especialista em endodontia. Periodontite apical sintomática é definida como uma inflamação do ligamento periodontal apical, produzindo sintomas clínicos que envolvem uma resposta dolorosa a percussão e/ou palpação. Esta condição pode ou não vir acompanhada de alterações em imagens radiográficas. (Dependendo do estágio da doença, pode haver um contorno normal do ligamento periodontal ou, em casos de lesões crônicas reagudecidas, podemos observar uma imagem radiolúcida no periapice). Por outro lado, a periodontite apical assintomática é definida como uma inflamação acompanhada da destruição do periodonto, oriuna de microorganismos advindos da polpa dental infectada. Radiograficamente aparece como uma área radiolúcida no periapice dental e não possui sintomas clínicos (sem dor a palpação ou percussão).

Para o grupo controle foram utilizados dois ligamentos periodontais (LP). Os LP foram obtidos de terceiros molares hígidos indicados para extração.

Isolamento do RNA tecidual e miRNA

As amostras foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezers* a -80°C. As lesões foram submetidas à análise de SNG realizada pela empresa *ArraystarInc* (Rockville, MD, USA). O RNA total foi extraído e a integridade do RNA das amostras foi verificado pela taxa OD260 por meio do *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As taxas OD₂₆₀-OD₂₈₀ foram analisadas, sendo um indicador de possível impureza do RNA. O critério de inclusão das amostras foi possuírem uma taxa de A₂₆₀/A₂₈₀ entre 1,8 e 2,1.

Preparação da biblioteca de sequenciamento

O RNA total de cada amostra foi extraído e utilizado para preparar a biblioteca de sequenciamento do miRNA: o RNA foi ligado sequencialmente a pequenos adaptadores de RNA nas posições 3' e 5'. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado e amplificado utilizando-se *primers* RT e *primers* de amplificação do *Illumina*. Subsequentemente fragmentos de 130-150 pb amplificados em PCR (correspondentes a pequenos RNAs de 15-35 nucleotídeos) foram extraídos e purificados em gel PAGE. Após as bibliotecas completas serem quantificadas no *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), os fragmentos de DNA foram desnaturados com 0,1M de NaOH para gerar moléculas simples de DNA, capturadas em células de fluxo do *Illumina*, amplificadas e finalmente sequenciadas em 51 ciclos no *IlluminaHiSeq* de acordo com instruções do fabricante. As bibliotecas completas foram quantificadas utilizando o *Agilent Bioanalyzer* (Agilent, Santa Clara, USA).

Geração de Clusters

As amostras foram diluídas a uma concentração final de 8 ppM (partes por milhão) e a geração de *clusters* foi realizada pelo *IlluminaBot* utilizando o kit

TruSeq Rapid SR cluster (Illumina, San Diego, USA), segundo instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado no *IlluminaHiSeq 2000* utilizando o kit *TruSeq Rapid SBS* (Illumina, San Diego, USA) também de acordo com instruções do fabricante.

Análise dos dados

As sequências foram geradas na base *IlluminaHiSeq* e salvas no formato FASTQ: contendo informações da leitura, as sequências e a qualidade da codificação. Subsequentemente, o adaptador 3' foi aparado das leituras e as leituras com menos de 15 nucleotídeos (nt) foram descartados. As novas leituras foram salvas no formato FASTA.

As leituras (comprimento ≤ 15 nt) foram alinhadas com a *mirBase 21* humana de pre-miRNA, utilizando o *software NovoAlign* (Novocraft Technologies, Selangor, Malaysia). Para o alinhamento de miRNA a máxima incompatibilidade aceita foi 1. Leituras menores de 2 foram descartadas quando o cálculo da expressão do miRNA foi efetuada. A normalização foi determinada por ppM.

As comparações foram feitas entre miRNAs altamente e pouco expressos em periodontites sintomáticas e assintomáticas e grupo controle; *2-Fold Changes* (FC) na expressão foram consideradas estatisticamente significantes.

O *software miRDeep2* foi utilizado para prever novos miRNAs. Por meio de uma análise padrão foi possível observar miRNAs diferentemente expressos e prever novos miRNAs. Para a predição de novos miRNAs, todos os dados sequenciados foram agrupados a partir dos arquivos de todos os adaptadores 3': todas as sequências adaptadas com comprimento < 17 pb e incompatibilidade > 1 foram excluídos. O *miRDeep score* e a probabilidade estimada de um candidato a novo miRNA ser positiva verdadeira foi calculada. (36)

Vias de Sinalização

A análise das vias de sinalização foi realizada utilizando o *software Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEDGG). O teste Exato de Fisher foi utilizado para determinar o p-valor da via de ação.

Resultados

Os índices OD A₂₆₀/A₂₈₀ das amostras foram entre 1,81 e 2,09. Um miRNA foi considerado altamente expresso quando o *Fold Change* foi $\geq 1,5$ e pouco expresso quando $\leq 0,67$. Adicionalmente, o valor p deveria ser $< 0,05$.

Mais de 800 miRNAs foram expressos em periodontites apicais e controles. Destes, quando comparadas periodontites apicais com controles, observamos que 12 foram altamente expressos enquanto 84 foram pouco expressos. Os 5 miRNAs com os maiores e os 5 com os menores FC estão listados na Tabela 1. O miR-10a-5p foi o mais expresso (FC 8,44) comparando periodontite apical e controles.

Tabela 1 - miRNAs diferentemente expressos						
Altamente expressos				Pouco expressos		
Grupos	miRNA	<i>Fold Change</i>	Valor p	miRNA	<i>Fold Change</i>	valor p
Periodontite apical x	hsa-miR-10a-5p	8,44	0,02	hsa-miR-128-3p	0,21	0,00
	hsa-miR-155-5p	4,54	0,02	hsa-miR509-3p	0,21	0,00
Controle	hsa-miR-novel-chr3_40372	3,75	0,02	hsa-miR-128-3p	0,19	0,00
	hsa-miR-7-5p	3,67	0,01	hsa-miR-514a-3p	0,19	0,00
	hsa-miR-142-5p	3,64	0,02	hsa-miR-891a-5p	0,14	0,00
Sintomático	hsa-miR-218-5p	1,93	0,03	hsa-miR-330-3p	0,63	0,03
x				hsa-miR-411-5p	0,52	0,03
				hsa-miR-129-5p	0,50	0,03
Assintomático				hsa-miR-9-5p	0,38	0,05
				hsa-miR-375	0,29	0,04
				hsa-miR-127-3p	0,24	0,01

Tabela 1: Os 5 miRNAs com os maiores e menores FC quando comparados os grupos Periodontite apical e Controles e o miRNA altamente e os pouco expressos da comparação Sintomático x Assintomático.

Ao se analisar periodontites apicais sintomáticas e assintomáticas o miRNA hsa-miR-218-5p foi altamente expresso (FC 1,93) enquanto seis miRNAs foram pouco expressos. (Tabela1)

O *software* miRDeep2 conseguiu prever aproximadamente 514 novos miRNAs. Os que apresentaram os maiores miRDeep2 scores (>50), maior

probabilidade de positivo verdadeiro (>42%), *read counts* acima de 100 e o *Fold p*-valor significativo estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Novos miRNAs				
ID previsto	<i>miRDeep score</i>	Probabilidade de positivo verdadeiro	<i>Read counts</i> totais	<i>Randfold p</i> valor significativo
chr9_57571	222518	51 ± 9%	435937	Sim
chr18_20516	5073	51 ± 9%	29557	Sim
chrY_62523	958	51 ± 9%	3840	Sim
chrX_61699	58,3	51 ± 9%	521	Sim
chr18_19980	28,9	51 ± 9%	450	Sim
chr5_45101	7,6	51 ± 9%	190	Sim
chr11_5638	6,1	51 ± 9%	170	Sim
chr16_16787	5,1	51 ± 9%	146	Sim
chr7_53446	6,1	51 ± 9%	129	Sim
chr11_5473	4,5	51 ± 9%	126	Sim
chr2_33098	4,0	51 ± 9%	123	Sim
chr3_38883	3,4	51 ± 9%	115	Sim
chr22_32673	3,4	51 ± 9%	107	Sim

Tabela 2: Possíveis novos miRNAs com os maiores *miRDeep2 scores* (>50), maior probabilidade de positivo verdadeiro (>42%), *read counts* acima de 100 e um valor p de FC estatisticamente significantes.

O SNG forneceu as vias de ação molecular das periodontites apicais e do controle e também as vias entre periodontites apicais sintomáticas e assintomáticas. Os genes envolvidos nestas vias estão detalhados na Tabela 3. As vias de ação com menores valores p e envolvidas no processo inflamatório foram selecionados.

Tabela 3 – Vias de ação			
Pouco regulados			
Grupo	Via de ação	Fisher (p valor)	Genes
Periodontite apical x Controle	AMPK	0,00	CCNA2//G6PC3//PFKL//PFKM//PIK3CD//PPARG//RHEB//SLC2A4
	FoxO	0,00	G6PC3//GRM1//IKBKB//NLK//PIK3CD//PLK2//SLC2A4//SOS2
	Receptor de célula B	0,00	GSK3B//IKBKB//NFKB1//PIK3CD//SOS2
Sintomático x Assintomático	Hippo	0,01	CTNNA1//FRMD6//ID2//NF2//SCRIB//TEAD1//WNT5A
	Via de sinalização da pluripotência de células tronco	0,02	FGFR1//ID2//LHX5//MAP2K1//ONECUT1//WNT5A
	Invasão bacteriana em células epiteliais	0,03	RPC1B//CDC42//CTNNA1//SEPT12
Altamente regulados			
Periodontite apical x Controle	Diferenciação de Osteoclastos	0,00	CALCR//CSF1R//FOS//PIK3CA//RELA//RELB//SOCS1//SP1
	cAMP	0,00	ATP1B1//CAMK2D//FOS//GLI3//GNAS//PDE4B//PDE4D//PIK3CA//PTCH1//RELA
	TNF	0,00	CEBPB//FOS//MAP3K5//PIK3CA//RELA//RPS6KA4//RPS6KA5
Sintomático x Assintomático	Ritmo circadiano	0,00	GNAI2//GNG3//GRIA2//GUCY1A2
	Fosfatidilinositol	0,00	CDS1//IMPAD1//MTMR1//PLCG1
	Adesão focal	0,01	ACTN1//FLNC//PPP1R12C//RELN//TNC

Tabela 3: Vias de ação pouco e altamente reguladas nas duas comparações: lesões x controles e sintomáticas x assintomáticas. Na tabela é possível a definição da via de ação, o p valor, e os genes que atuam em cada uma das vias.

Os miRNAs altamente expressos das periodontites apicais apresentaram 24 diferentes vias de ação apresentando valores estatisticamente significantes. Para estes miRNAs altamente expressos destaca-se a via da diferenciação de osteoclastos ($p=0,00$), fator de necrose tumoral (*TNF*) ($p=0,00$) e *cAMP* ($p=0,00$). Os poucos expressos apresentaram 40 diferentes vias de sinalização, apresentando valores significantemente as vias de *AMPK* ($p=0,00$), receptores de células B ($p=0,00$) e *FoxO* ($p=0,00$).

Quando as vias entre lesões sintomáticas e assintomáticas foram comparadas, os miRNAs altamente expressos apresentaram modular 17 vias de ação enquanto que os poucos expressos apresentaram 10 vias de ação.

Discussão

MiRNAs são pequenas moléculas não codificadoras que tem se destacado na tentativa de melhor entender as mudanças moleculares que ocorrem em várias doenças. (25) Os miRNAs exercem um papel essencial na regulação da expressão

gênica por meio do silenciamento ou digestão de RNA mensageiros (mRNA). (37, 38)

Um papel importante na resposta inflamatória tem sido atribuído aos miRNAs, uma vez que eles são capazes de regular o recrutamento e diferenciação de células inflamatórias nos tecidos infectados. (29, 31, 39, 40) Eles também tem uma importante função na regulação da modulação óssea na doença periodontal (32, 33, 38) e podem contribuir no recrutamento de células T em periodontite periapical, podendo ser um potencial alvo terapêutico para o seu controle. (41)

Comparando as periodontites apicais com controles observou-se que um grande número de miRNAs foram diferencialmente expressos: dez foram altamente expressos enquanto oitenta e quatro foram pouco expressos. O destaque dos altamente expressos foi o miR-10a-5p (FC 8,4). Em humanos o precursor mir-10 é duplicado em duas variantes distintas: mir-10a e mir-10b. O mir-10a está localizado na posição 17q21 do cromossomo entre os genes *HOX4B* e *HOX5B*. Acredita-se que haja uma forte correlação entre estes miRNAs e os genes da família *HOX*. O mir-10a faz parte de uma família de RNAs que possui outros miRNAs como miR-10, miR-51, miR-57, miR-99 e miR-100. (42)

O miR-10a-5p tem sido referido como um fator de risco para a mortalidade de pacientes sépticos. Em uma análise sorológica desses pacientes, os autores constataram que houve um aumento significativo do nível de miR-10a-5p ($p < 0.05$) dos pacientes que vieram a óbito. (43) Este fato demonstrou uma forte correlação deste miRNA em infecções.

Um outro miRNA altamente expresso no nosso estudo, foi o miR-155-5p. Este achado corroborou outro estudo onde ele também foi altamente expresso em lesões periapicais sendo capaz de induzir um fenótipo proinflamatório em ligamentos periodontais humanos. (44) A expressão do miR-155-5p também se mostrou significativa entre gengiva inflamada e sadia, mostrando uma relação próxima da ação dos miRNAs na inflamação periodontal. (45) Adicionalmente a isto, este miRNA parece regular receptores de células *Toll like* (TLRs) em inflamação periodontal. (46)

Os mecanismos moleculares que envolvem a expressão de miRNAs na periodontite apical sintomática e assintomática precisam ser melhores estudados e discutidos. No presente estudo foi utilizado o SNG para realizar um perfil da expressão de miRNAs em periodontites apicais com o objetivo de identificar o

papel dos miRNAs na modulação da resposta imune quando a sintomatologia estava presente ou ausente. Os resultados mostraram que mais de 800 miRNAs foram expressos em periodontites apicais e controles. Destes, um foi altamente expresso e cinco pouco expressos em lesões periapicais sintomáticas.

O miR-218-5p foi altamente expresso em periodontites apicais sintomáticas (FC 1,93). O precursor do miRNA miR-218 é um pequeno RNA não codificador que realiza a regulação gênica por meio da ligação reversa. Este miRNA tem se mostrado específico para vertebrados e vem sendo descrito em outros estudos como causadores de efeitos regulatórios no processo de osteogênese em células tronco de ligamentos periodontais.(47) Estudos recentes também demonstraram uma alta expressão do miR-218-5p em tecido gengival inflamado quando comparado com tecido sadio (FC 2-5).(45) A alta expressão deste miRNA parece ser um alvo importante para o processo inflamatório.

Um estudo prévio demonstrou que o miR-330-3p foi altamente expresso e pode modular células *natural killer* (NK) em pacientes com síndrome de fadiga crônica.(44) Em nosso estudo o miR-330-3p foi pouco expresso em periodontites apicais sintomáticas. Outro miRNA pouco expresso foi o miR-129-5p. Esse miRNA foi reportado previamente sendo altamente expresso em pacientes com carcinoma hepatocellular (HCC) e está relacionado com células T regulatórias (Tregs).(48) Ambos os miRNAs foram pouco expressos em periodontites apicais sintomáticas. Uma vez que miRNAs podem modular estas células, é esperado a sua presença abundante em um processo agudo.

Estes resultados podem contribuir para um melhor entendimento do desenvolvimento, progressão e sintomatologia de lesões periapicais, sugerindo que os miRNAs podem ter um papel importante na modulação de respostas inflamatórias das periodontites apicais.

Utilizando o *software* miRDeep2 foi possível realizar a predição de novos miRNAs. MiRDeep2 é um *software* baseado em algoritmos que utiliza um modelo simples para o precursor de miRNA processado por um *Dicer*, capaz de recuperar a maior parte de miRNAs que já são conhecidos no presente em amostras heterogêneas profundamente sequenciadas e reportar novos miRNAs com alta confiança. No *software* estão inclusos controles estatísticos que são capazes de estimar a taxa de positivo verdadeiro e a sensibilidade das predições do miRDeep2. (36)

O *software* é capaz de prever o precursor e a sequência madura dos novos miRNAs. Utilizando o *software miRDeep 2* foi possível realizar a predição de quinhentos e quatorze novos miRNAs em periodontites sintomáticas e assintomáticas. Desses, cento e quarenta e sete tiveram uma probabilidade de verdadeiro positivo acima de 42% e cento e dezenove tiveram um *Randfold* p-valor significativo. Desses, vinte e quatro novos miRNAs obtiveram *read counts* acima de cem. As predições chr9_57571 e chr18_20516 foram as que obtiveram os maiores *miRDeep scores* (222251,8 e 15073 respectivamente). Quanto maior o *miRDeep score* mais confiável é a predição realizada. Os novos miRNAs aqui encontrados podem ser estudados e validados em estudos futuros.

Conclusão

MiRNAs são diferentemente expressos em periodontites apicais sintomáticas e assintomáticas e podem ter um papel importante na modulação de lesões periapicais. O miRNA hsa-miR-10a-5p apresentou alta expressão em periodontites apicais e o miRNA hsa-miR-218-5p pode ser um alvo importante a ser explorado em lesões sintomáticas.

Referências

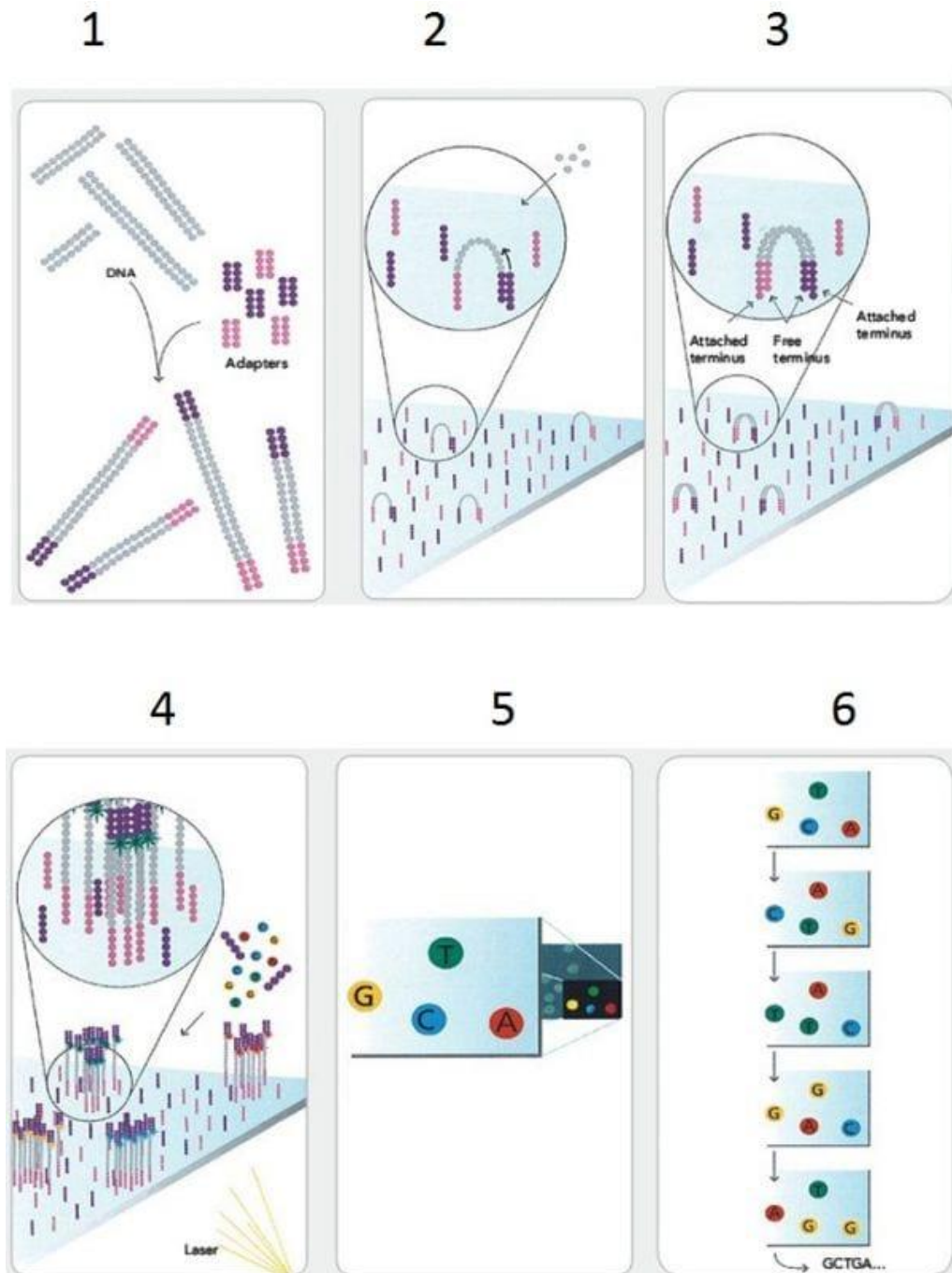
1. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1965;20(3):340-349.
2. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of oral microbiology* 2011;3(1):5304.
3. Gutmann JL, Baumgartner JC, Gluskin AH, Hartwell GR, Walton RE. Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states. *Journal of Endodontics* 2009;35(12):1658-1674.
4. Carneiro E, Parolin A, Wichnieski C, Rosa E, Neto US, Westphalen V, et al. Expression levels of the receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin and the number of gram-negative bacteria in symptomatic and asymptomatic periapical lesions. *Archives of oral biology* 2017;73:166-171.
5. Meltzer PS. Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature* 2005;435(7043):745-746.
6. Baltimore D, Boldin MP, O'connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature immunology* 2008;9(8):839-845.

7. Katz MG, Fagnoli AS, Kendle AP, Hajjar RJ, Bridges CR. The role of microRNAs in cardiac development and regenerative capacity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2016;310(5):H528-H541.
8. Schulte C, Westermann D, Blankenberg S, Zeller T. Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in heart failure with preserved and reduced ejection fraction. *World journal of cardiology* 2015;7(12):843.
9. Tili E, Michaille J-J, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *The Journal of Immunology* 2007;179(8):5082-5089.
10. Chen X-M, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282(39):28929-28938.
11. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006;103(33):12481-12486.
12. Gantier MP, Sadler AJ, Williams BR. Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. *Immunology and cell biology* 2007;85(6):458-462.
13. Motedayyeh H, Ghotloo S, Saffari M, Sattari M, Amid R. Evaluation of microRNA-146a and its targets in gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology* 2015;86(12):1380-1385.
14. Xia Z, Chen C, Chen P, Xie H, Luo X. MicroRNAs and their roles in osteoclast differentiation. *Frontiers of medicine* 2011;5(4):414-419.
15. Zhong S, Zhang S, Bair E, Nares S, Khan AA. Differential expression of microRNAs in normal and inflamed human pulps. *Journal of endodontics* 2012;38(6):746-752.
16. Bullard JH, Purdom E, Hansen KD, Dudoit S. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC bioinformatics* 2010;11(1):94.
17. Friedländer MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S, et al. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nature biotechnology* 2008;26(4):407-415.
18. Chan LT, Zhong S, Naqvi AR, Self-Fordham J, Nares S, Bair E, et al. MicroRNAs: new insights into the pathogenesis of endodontic periapical disease. *Journal of endodontics* 2013;39(12):1498-1503.
19. Stoecklin-Wasmer C, Guarnieri P, Celenti R, Demmer R, Kebschull M, Papapanou P. MicroRNAs and their target genes in gingival tissues. *Journal of dental research* 2012;91(10):934-940.
20. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007;104(5):1604-1609.
21. Sonkoly E, Ståhle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. In: *Seminars in cancer biology*; 2008: Elsevier; 2008. p. 131-140.
22. He M, Song G, Yu Y, Jin Q, Bian Z. LPS-miR-34a-CCL22 axis contributes to regulatory T cell recruitment in periapical lesions. *Biochemical and biophysical research communications* 2015;460(3):733-740.

23. Lund AH. miR-10 in development and cancer. *Cell death and differentiation* 2010;17(2):209.
24. Huo R, Dai M, Fan Y, Zhou J, Li L, Zu J. Predictive value of miRNA-29a and miRNA-10a-5p for 28-day mortality in patients with sepsis-induced acute kidney injury. *Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University* 2017;37(5):646.
25. Petty RD, McCarthy NE, Le Dieu R, Kerr JR. MicroRNAs hsa-miR-99b, hsa-miR-330, hsa-miR-126 and hsa-miR-30c: potential diagnostic biomarkers in natural killer (NK) cells of patients with chronic fatigue syndrome (CFS)/myalgic encephalomyelitis (ME). *PloS one* 2016;11(3):e0150904.
26. Xie Y-f, Shu R, Jiang S-y, Liu D-l, Zhang X-l. Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues. *International journal of oral science* 2011;3(3):125-134.
27. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Translational Research* 2011;157(4):163-179.
28. Hao Y, Ge Y, Li J, Hu Y, Wu B, Fang F. Identification of MicroRNAs by Microarray Analysis and Prediction of Target Genes Involved in The Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Journal of Periodontology* 2017(0):1-11.
29. Chen L, Ma H, Hu H, Gao L, Wang X, Ma J, et al. Special role of Foxp3 for the specifically altered microRNAs in Regulatory T cells of HCC patients. *BMC cancer* 2014;14(1):489.

Anexos

Anexo I – Metodologia *IlluminaSeq*

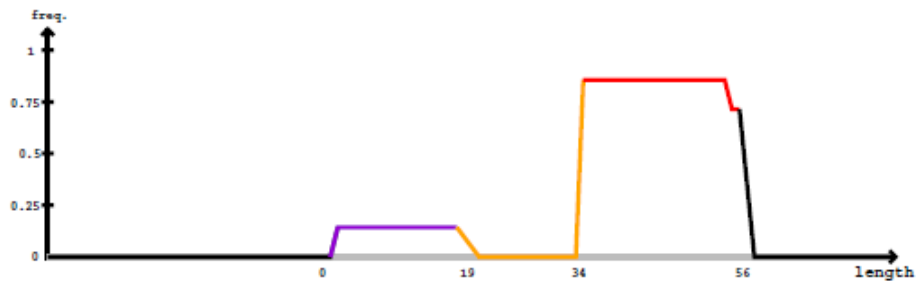
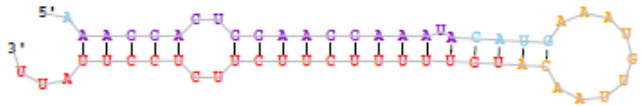


- 1) DNA fragmentado e ligado a adaptadores. 2) DNA de fita simples é ligado a uma superfície na células dos canais do sequenciador. 3) São adicionados a enzima e os nucleotídeos não fluorescentes e iniciada a amplificação. 4) Célula contendo "cluster" únicos de DNA, são adicionados os nucleotídeos fluorescentes, primers e polimerase, gerando a cópia do DNA

sequência do DNA. **Referência: *Illumina's Solexa Sequencing Technology***

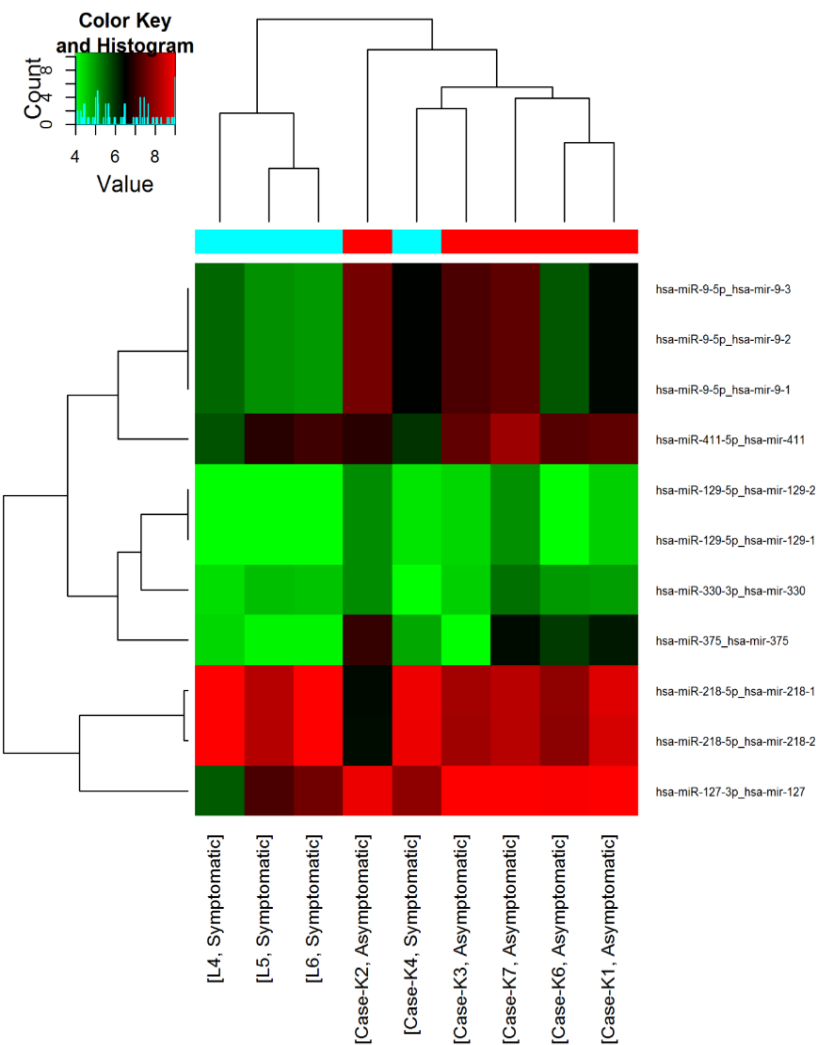
Anexo II – Metodologia: Predição de possíveis novos miRNAs

```
Provisional ID      : chr1_23215
Score total        : 3.2
Score for star read(s) : 3.9
Score for read counts : -2.3
Score for mfe       : 0.7
Score for randfold   : 1.6
Score for cons. seed : -0.6
Total read count     : 7
Mature read count    : 6
Loop read count      : 0
Star read count      : 1
```

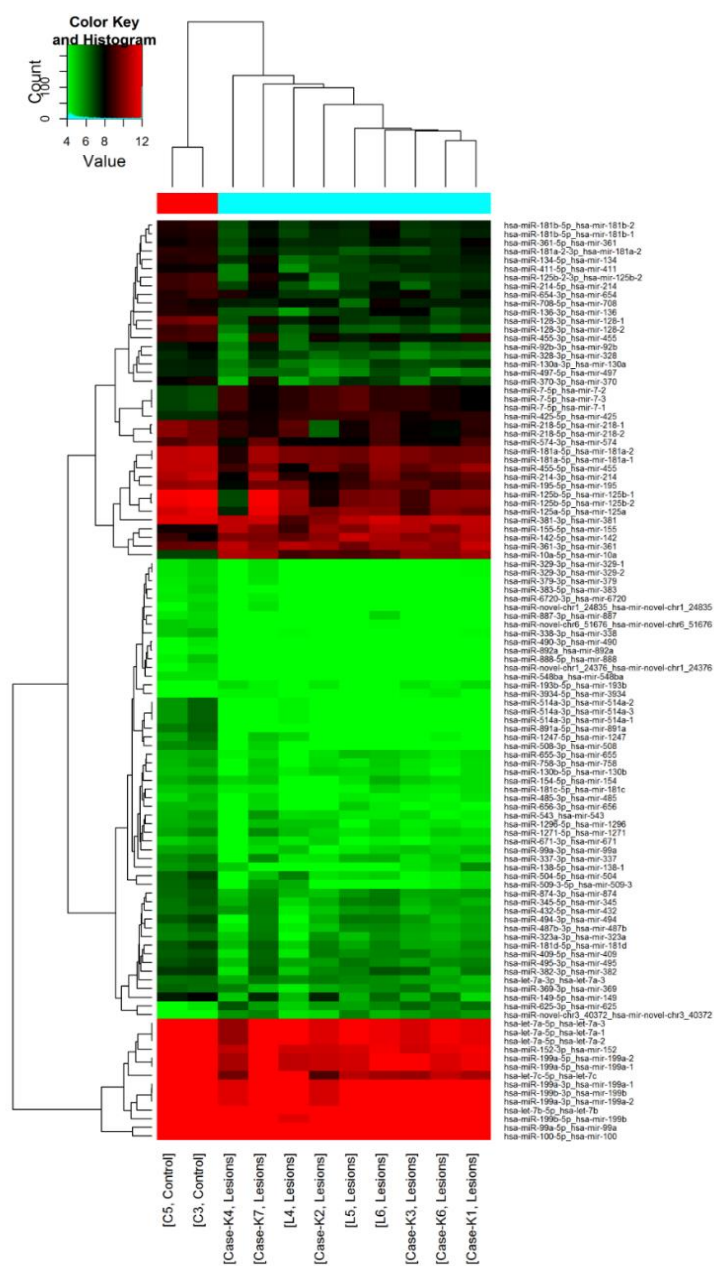
[illegible]

Anexo III - Heatmaps

Sintomático x Assintomático



Lesões x Controles



Anexo IV – Lista de Abreviaturas e Siglas

miRNA	–	Micro molécula de ácido ribonucleico
SNG	–	Sequenciamento de Nova Geração
KEDGG	–	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
RNA	–	Ácido ribonucleico
mRNA	–	RNA mensageiro
m-RNA-seq	–	Sequenciamento de RNA mensageiro
EPT	–	Eletric pulpal test
PDL	–	LPeriodontal dental ligament
AAE	–	Associação Americana de Endodontia
ND	–	NanoDrop
PUC-PR	–	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
cDNA	–	DNA complementar
PCR	–	Reação de cadeia polimerase
nt	–	Nucleotídeos
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
NaOH	–	Hidróxido de Sódio
Pm	–	Partes por milhão
pre-miRNA	–	Percursor de miRNA
TPM	–	Tags por milhão
FC	–	Fold Change

FDR	–	Controle da taxa de falso positivos (false discovery rate)
AMPK	–	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
FoxO	–	Forkhead box O3
cAMP	–	Adenylyl cyclase pathway
TNF	–	Fator de necrose tumoral
NK	–	Natural killer cells
HCC	–	Carcinoma hepatocellular
Tregs	–	Células T regulatórias
Fox3p	–	Forkhead box P3
Chr	–	Cromossomo
Has	–	Humano

Anexo V – Parecer do Comitê de Ética



Committee for the Protection of Human Subjects

6410 Fannin Street, Suite 1100
Houston, Texas 77030

NOTICE OF APPROVAL TO IMPLEMENT REQUESTED CHANGES

February 22, 2017

HSC-DB-12-0280 - Genetic susceptibility to periodontal and periapical disease AND The Role of Heat shock proteins in Periapical disease AND Genetic predisposition to non-healing response in persistent apical periodontitis: the role of matrix metalloproteinases and cytokine gene polymorphisms AND MMP-7 and TIMP-1, new targets in predicting poor wound healing in apical periodontitis AND Characterization of immune regulatory and inflammatory cells in human periapical lesions AND DNA methylation levels as a potential biomarker in the development of periapical lesions AND Identifying Key Targets for Apical Periodontitis Development and Progression AND miRNA-Regulated Cytokines in Apical Periodontitis AND Investigating a potential correlation between endodontic pathologies and cardiovascular diseases AND Single nucleotide polymorphisms in β -catenin destruction complex genes: potential role in apical periodontitis development

PI: Dr. Renato Silva

Reference Number: 148155

PROVISIONS: Unless otherwise noted, this approval relates to the research to be conducted under the above referenced title and/or to any associated materials considered at this meeting, e.g. study documents, informed consent, etc.

APPROVED: By Expedited Review and Approval

CHANGE APPROVED: Addition of Title: Single nucleotide polymorphisms in β -catenin destruction complex genes: potential role in apical periodontitis development
Addition of Co-Investigators: Ahmad Reza Noroozi & Zegar Zegar
Single nucleotide polymorphisms in β -catenin destruction complex genes: potential role in apical periodontitis development - new consent - new title Version 1.1

REVIEW DATE: 02/01/2017

APPROVAL DATE: 02/22/2017

CHAIRPERSON: Charles C. Miller, III, PhD

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'C. Miller III'.

Upon receipt of this letter, and subject to any provisions noted above, you may now implement the changes approved.

ARTIGO 2 - VERSÃO EM INGLÊS

Title page

Next-generation miRNA sequencing identifies high miRNA hsa-miR-10a-5p expression in apical periodontitis and miRNA hsa-miR-218-5p as a key marker in symptomatic apical periodontitis

Acknowledgments

The authors deny any conflicts of interest

The authors are thankful to the study participants

This work was supported by the American Association of Endodontists Foundation Research Grants to CW and RMS.

Abstract

Introduction: MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs that control gene expression through RNA silencing mechanisms. We hypothesized that miRNAs effects in immune response-related genes may contribute to the dynamics of apical periodontitis development. **Material and Methods:** Total RNA was extracted from eleven apical tissues collected from discarded teeth (four symptomatic and five asymptomatic cases) and two healthy periodontal ligaments (controls) and used as template to prepare the miRNA enrichment capture library. miRNA sequencing was performed using Illumina HiSeq2000. Up- or down-regulated miRNAs comparisons were performed in apical periodontitis vs. controls and symptomatic vs. asymptomatic cases (Pearson's correlation). Pathway analysis was performed using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEDGG) software. **Results:** Over 800 miRNAs were expressed in apical periodontitis and healthy periodontal ligament tissues. miRNA hsa-miR-10a-5p was highly expressed in apical periodontitis samples (fold change 8.44) when compared to controls. miRNA (has-miR-218-5p) was upregulated in symptomatic cases (1.93 fold change). Upregulated miRNAs in apical periodontitis were correlated with osteoclast differentiation and TNF signaling pathway while downregulated miRNAs were correlated with AMPK and Bcell receptor signaling pathway ($P < 0.05$). **Conclusion:** MicroRNAs may have a role in modulating gene expression interfering with the wound healing process in apical periodontitis. miRNA hsa-miR-218-5p may be an important target to be explored in cases of symptomatic apical periodontitis.

Key words: miRNA, RNA, apical periodontitis, sequencing, symptoms

Introduction

Apical periodontitis (AP) represents a local immune response to the progression of microorganisms from an infected root canal space to the periapical area. (1) Inflammation and bone resorption may occur as a consequence of the interaction between microbial infection and the host response. (21) During this response a number of cell types present in the apical area release cytokines, chemokines, leukotrienes, and prostaglandins. These inflammatory mediators reinforce the recruitment of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and other leukocytes which ultimately drives the destruction of periapical tissues. (21)

Based on clinical symptoms, apical periodontitis may be classified as a symptomatic or asymptomatic. (22) The bacterial load seems to influence the symptoms and radiographic size of the lesion. (23)

Current efforts now include unveiling the etiologic variants and their biological functions that may contribute to the apical periodontitis development and progression.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules potentially complementary to mRNAs that can interfere with normal gene expression and therefore in the organism response. (24, 25) miRNAs have showed an important function on regulating biological processes, cell differentiation and proliferation, apoptosis (25) and, most recently, inflammatory disease. (25-27)

The importance of miRNA in the regulation of innate immune response is evident in a series of studies in which various miRNAs were shown to alter the immune response dramatically (28-32). In dentistry, the role of miRNAs is also being speculated. miRNAs were found in saliva and are considered important players in oral cancer and bone modulation in periodontitis (32, 33). In endodontics one study identified differential expression of miRNAs in healthy and diseased human dental pulps (34). These findings show that miRNAs have an important role in inflammation and immunity modulation, which are major aspects of pulpal and periapical pathologies.

Next generation sequencing (NGS) is an emerging and promising tool that have been applied to monitor genome-wide transcription levels (m-RNA-seq)(35). This tool is used for accurate large-scale sequencing.

It seems evident that miRNAs have an important role in modulation of the immune system; however, their efficiency in modulation of the host inflammatory immune response in an apical periodontitis scenario remains unexplored. Here, we hypothesized that the presence of miRNAs in immune-response-related genes may contribute to the dynamics of periapical lesion development. Next-generation sequencing was used to determinate differentially expressed miRNAs and to predict possible novel miRNAs in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis.

Material and Methods

Subjects and Samples

This study was approved by the Committee for Protection of Human Subjects at the University of Texas Health Science Center at Houston (HSC-DB-12-0280). Subjects were patients presenting with apical periodontitis, characterized radiographically as radiolucent apical periodontitis showing absence of the periodontal ligament space and discontinuity of the lamina dura. All samples were obtained from teeth without pulpal sensitivity (no response to cold and EPT tests), without endodontic treatment and referred for tooth extraction. Patients with medical conditions requiring the use of systemic modifiers of bone metabolism or other assisted drug therapy (i.e., systemic antibiotics, anti-inflammatory, hormonal therapy) during the last 6 months before initiation of the study, patients with preexisting conditions such as periodontal disease, and pregnant or lactating women were excluded from the study.

Teeth and apical tissues were collected at the urgent care clinic of the University of Texas Health Science Center at Houston, School of Dentistry. Nine cases diagnosed with pulp necrosis (5 asymptomatic and 4 symptomatic apical periodontitis) were selected for this study. Pulpal and periapical diagnosis were based on the AAE diagnosis criteria and determined by an endodontist. Two healthy periodontal ligaments obtained from 3rd molars with healthy/vital pulp tissues and normal apical tissues and referred for extraction were used as controls.

RNA and miRNA isolation

Samples were collected, freshly frost with liquid nitrogen and stored in

-80° freezers. Total RNA was extracted and the integrity of RNA samples was determined by OD₂₆₀ using a NanoDrop ND-1000 instrument (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). The OD₂₆₀-OD₂₈₀ ratios were inspected as an indicator of potential impurity. The inclusion criterion for RNA was OD of A₂₆₀/A₂₈₀ ratio between 1.8 and 2.1. Next generation sequencing analyses was performed by Arraystar Inc. (Rockville, MD, USA).

Sequencing Library Preparation

The total RNA extracted of each sample was used to prepare the miRNA sequencing library: the RNA was sequentially ligated to 3' and 5' small RNA adapters. cDNA was then synthesized and amplified using Illumina's proprietary RT primers and amplification primers. Subsequently, 130-150 bp PCR amplified fragments (correspond to 15-35 nt small RNAs) were extracted and purified from the PAGE gel. Completed libraries were quantified with Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), DNA fragments were denatured with 0,1M NaOH to generate single-stranded DNA molecules, captured on Illumina flow cells, amplified in situ and finally sequenced for 51 cycles on IlluminaHiSeq according to manufacturer's instruction. The completed libraries were quantified using the Agilent Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, USA).

Cluster Generation

Samples were diluted to a final concentration of 8 pM. Cluster generation was performed on the IlluminaBot using TruSeq Rapid SR cluster kit (Illumina, San Diego, USA), following manufacturer's instructions. Sequencing was performed on IlluminaHiSeq 2000 using TruSeq Rapid SBS Kits (Illumina, San Diego, USA) according to manufacturer's instructions.

Data Analysis

Raw sequences were generated as clean reads from IlluminaHiSeq Real-time base calling and quality filtering. The clean reads were recorded in FASTQ format, containing the read information, sequences and quality encoding.

Subsequently the 3' adapter sequence was trimmed from the clean reads and the reads with lengths shorter than 15 nucleotides (nt) were discarded. As the 5'-adaptor was also used as the sequencing primer site, the 5'-adaptor sequence is not present in the sequencing reads. The trimmed reads were recorded in FASTA format. The adaptor trimmed reads were made by removing the adaptor sequence for the reads.

The trimmed reads (length ≤ 15 nt) were aligned to the human pre-miRNA in mirBase 21, using NovoAlign software (Novocraft Technologies, Selangor, Malaysia). For miRNA alignment, the maximum mismatch was 1. Reads with counts less than 2 were discarded when calculating the miRNA expression. The normalization was determined by Tags per million on aligned miRNA (TPM).

Comparisons were made between up- or downregulated miRNAs in asymptomatic versus symptomatic apical periodontitis and apical periodontitis versus control group and 2-Fold Changes were calculated (FC). miRNAs were considered upregulated when the FC was $\geq 1,5$ and downregulated when $\leq 0,67$. In addition the p value were considered significant when $< 0,05$.

miRDeep software was used to predict novel miRNAs. The standard analysis was able to provide information about differentially expressed miRNA's and the prediction of novel miRNAs. For novel miRNA prediction, all sequence data was pooled from all 3'Adapter trimmed files: all adapter trimmed sequence which Length were $< 17\text{bp}$ and mismatch > 1 were excluded from prediction pipeline. The miRDeep score and the estimated probability that the miRNA candidate is a true positive were calculated. (36)

Pathway analysis

Pathway analysis was performed using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEDGG) Software. Fisher exact test was used to determinate the enrichment p-value of the pathway ID.

Results

The OD ratios were between 1.81 and 2.09. Over 800 miRNAs were expressed in apical periodontitis and healthy periodontal ligament tissues.

When comparing apical periodontitis tissues and healthy periodontal ligaments, ten miRNAs were upregulated ($FC \geq 1.5$, $P < 0.05$) and 84 downregulated ($FC \leq 0,67$; $P < 0.05$). The five miRNAs with lowest and highest FC are listed on Table 1. hsa-miR-10a-5p was highly expressed in apical periodontitis samples when compared to controls. ($FC\ 8.44$; $P=0.02$).

Table 1 – Differently expressed miRNAs						
Upregulated				Downregulated		
Groups	miRNA	Fold Change	p value	miRNA	Fold Change	p value
Apical periodontitis x	hsa-miR-10a-5p	8,44	0,02	hsa-miR-128-3p	0,21	0,00
	hsa-miR-155-5p	4,54	0,02	hsa-miR509-3p	0,21	0,00
Control	hsa-miR-novel-chr3_40372	3,75	0,02	hsa-miR-128-3p	0,19	0,00
	hsa-miR-7-5p	3,67	0,01	hsa-miR-514a-3p	0,19	0,00
	hsa-miR-142-5p	3,64	0,02	hsa-miR-891a-5p	0,14	0,00
Symptomatic x	hsa-miR-218-5p	1,93	0,03	hsa-miR-330-3p	0,63	0,03
				hsa-miR-411-5p	0,52	0,03
Asymptomatic				hsa-miR-129-5p	0,50	0,03
				hsa-miR-9-5p	0,38	0,05
				hsa-miR-375	0,29	0,04
				hsa-miR-127-3p	0,24	0,01

Table 1: The five miRNAs with the highest and the lowest FCs when comparing apical periodontites with controls, and the differently expressed miRNAs when comparing symptomatic vs asymptomatic.

Comparing symptomatic with asymptomatic apical periodontitis, only one miRNA (has-miR-218-5p) was upregulated in symptomatic cases (1.93 FC, $P=0.03$) while six miRNAs were downregulated ($FC \leq 0.63$; $P < 0.05$) (Table 1).

With the New Generation Sequencing it was possible to identify the pathways that the expressed miRNAs are acting on. On Table 2 the three pathways with the higher relevance related with immune and-or inflammatory response, p values and the genes evolved in each pathway in both comparisons are listed.

Table 2 - Pathways				
Upregulated				
Group	ID	Definition	Fisher (p-value)	Genes
Apical periodontitis vs controls	hsa04152	AMPK	0,00	CCNA2//G6PC3//PFKL//PFKM//PIK3CD//PPARG//RHEB//SLC2A4
	hsa04068	FoxO	0,00	G6PC3//GRM1//IKBKB//NLK//PIK3CD//PLK2//SLC2A4//SOS2
	hsa04662	B cell receptor signaling pathway	0,00	GSK3B//IKBKB//NFKB1//PIK3CD//SOS2
Symptomatic vs asymptomatic	hsa04390	Hippo signaling pathway	0,01	CTNNA1//FRMD6//ID2//NF2//SCRIB//TEAD1//WNT5A
	hsa04550	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	0,02	FGFR1//ID2//LHX5//MAP2K1//ONECUT1//WNT5A
	hsa05100	Bacterial invasion of epithelial cells	0,03	RPC1B//CDC42//CTNNA1//SEPT12
Downregulated				
Apical periodontitis vs controls	hsa04380	Osteoclast differentiation	0,00	CALCR//CSF1R//FOS//PIK3CA//RELA//RELB//SOCS1//SP11 ATP1B1//CAMK2D//FOS//GLI3//GNAS//PDE4B//PDE4D//PIK3CA//PTCH1// RELA
	hsa04024	cAMP	0,00	
	hsa04668	TNF	0,00	CEBPB//FOS//MAP3K5//PIK3CA//RELA//RPS6KA4//RPS6KA5
Symptomatic vs asymptomatic	hsa04713	Circadian entrainment	0,00	GNAI2//GNG3//GRIA2//GUCY1A2
	hsa04070	Phosphatidylinositol signaling system	0,00	CDS1//IMPAD1//MTMR1//PLCG1
	hsa04510	Adesão focal	0,01	ACTN1//FLNC//PPP1R12C//RELN//TNC

Table 2: Pathways that were up and downregulated in both comparisons (lesions vs controls and symptomatic vs asymptomatic lesions) showing the ID, pathway definition, p value and the genes evolved in every pathway.

When comparing apical periodontitis and controls, downregulated miRNAs were associated to 40 different biological pathways, including the AMPK signaling pathway (p= 0,001), FoxO signaling pathway (p= 0,001) and B cell receptor signaling pathway (p= 0,001). The upregulated miRNAs were associated with 24 different pathways. Osteoclast differentiation (p= 0,001), cAMP signaling pathway (p=0,001) and TNF signaling pathway (p= 0,001) showed the most relevant significance.

Comparing symptomatic and asymptomatic apical periodontitis, downregulated miRNAs were associated with 10 different pathways. Hippo signaling pathway (p=0,01), signaling pathways regulating pluripotency of stem cells (p= 0,01) and bacterial invasion of epithelial cells (p= 0,02) showed the strongest correlation. The upregulated miRNAs may play a role in the modulation of 17 pathways. Of those, circadian entrainment (p= 0,001), phosphatidylinositol signaling system (p= 0,001) and focal adhesion (p= 0,001) pathways showed the strongest correlation.

The miRDeep2 software predicted approximately 514 novel miRNAs. The ones with the higher miRDeep2 scores (>50), higher probability of true positive (>42%), read counts over 100 and a significant fold p-value are listed in Table 3.

Table 3 - Novel miRNA's				
Prevision ID	miRDeep2 score	Probability of true positive	Total read count	Significant randfold p-value
chr9_57571	222251,8	51 +/- 9%	435937	yes
chr18_20516	15073	51 +/- 9%	29557	yes
chrY_62523	1958	51 +/- 9%	3840	yes
chrX_61699	258,3	51 +/- 9%	521	yes
chr18_19980	228,9	51 +/- 9%	450	yes
chr5_45101	97,6	51 +/- 9%	190	yes
chr11_5638	76,1	51 +/- 9%	170	yes
chr16_16787	75,1	51 +/- 9%	146	yes
chr7_53446	66,1	51 +/- 9%	129	yes
chr11_5473	64,5	51 +/- 9%	126	yes
chr2_33098	64	51 +/- 9%	123	yes
chr3_38883	63,4	51 +/- 9%	115	yes
chr22_32673	55,4	51 +/- 9%	107	yes

Table 3: Novel miRNA targets with higher miRDeep2 scores (>50), higher probability of true positive (>42%), read counts over 100 and a significant fold p-value.

Discussion

miRNAs are small non-coding molecules that have attracted considerable attention in an effort to understand the molecular changes in various diseases. (25) Studies demonstrate that miRNAs play essential roles in regulating gene expression. The relationship between miRNA expression patterns and target gene expression is complex, once the same miRNA can regulate hundreds of different target mRNAs. (49) In general, miRNAs can repress gene transcription by turning the gene “off” or by digesting the mRNA. (37, 38)

miRNAs seems to play an important role in inflammatory responses once they are capable of modulate the recruiting and the differentiation of inflammatory cells in the infected tissue, such as macrophages, dendritic cells, monocytes, T and B cells. (29, 31, 39, 40) They also have an important function in bone modulation in periodontal disease (32, 33, 38) and can contribute to the recruitment of T cells in periapical lesions, providing a potential therapeutic target for controlling this disease. (41)

Comparing AP and controls a large number of miRNA were differently expressed: ten were upregulated while eighty-four were downregulated. The highly expressed miRNA was miR-10a-5p (FC 8.4). In humans, the miR-10a precursor is duplicated into two variants: miR-10a and miR-10b. The miR-10a is located at the 17q21 position of the chromosome between HOX4B and HOX5B genes. There is

some evidence that there is a strong correlation between these miRNAs and the HOX family genes. The miR-10a belongs to a RNA Family that include others miRNAs as miR-10, miR-51, miR-57, miR-99 e miR-100.(42)

MiR-10a-5p is being referred as a risk factor for septic patients mortality. In a serum analysis of these patients, the authors showed that there is a highly increase level of miR-10^a-5p ($p < 0.05$) in the patients that died. (43) This findings demonstrate a strong correlation among this miRNA and infections.

The miR-155-5p was also highly expressed. This result was also shown in other study where this miRNA was also upregulated in periapical lesions inducing a proinflammatory phenotype in periodontal dental ligaments. (25) The expression of miR-155-5p was also significant when comparing healthy and inflamed gingival tissue, showing a close relation of the action of miRNAs in periodontal inflammation. (45) This miRNA is also reported as Toll like cells receptors (TLrs) regulator in periodontal inflammation. (46)

Molecular mechanisms involved in the expression of miRNAs in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis needs to be explored. In this study the NGS was used to make a deep profile of miRNAs expression in apical periodontitis with the aim of identify the role of the miRNAs in the immune response and modulation when there is or there isn't symptoms. The results showed over 800 miRNAs expressed in apical periodontitis and controls. Of those, one was upregulated and five were downregulated in symptomatic periodontitis.

MiR-218-5p was upregulated in symptomatic apical periodontitis (FC 1,93). The miR-218 precursor is a small non-coding RNA that regulates the gene expression by antitense binding. It seems to be specific for vertebrates and is being described in other studies as an important regulator in the osteogenic process of periodontal ligaments steam cells. (47) It was also demonstrated a upregulation of miR-218-5p in inflamed gingival tissue when compared with healthy ones (FC 2-5). (45) The upregulation of this miRNA seems to be an important target during the inflammatory process.

Previous studies demonstrated that upregulation of miR-330-3p can modulate natural killer cells (NK) in chronic fatigue syndrome (CFS). (44) In our study miR-330-3p was downregulated in symptomatic periapical periodontitis. MiR-129-5p was also downregulated. This miRNAs were previously reported as upregulated in hepatocellular carcinoma patients (HCC) and are correlated with

regulatory T cells (Tregs). (48) Both miRNAs were downregulated in symptomatic apical periodontitis. Once miRNAs are capable of modulate these cells, it is expected a large number of them in an acute process.

These research findings can contribute to a better understanding of the development, progression and symptomatology of apical periodontitis, suggesting that miRNAs have an important role in the modulation of the inflammatory response in these disease.

Using miRDeep we could also predict novel miRNAs. miReep is an algorithm software that use a simple model for miRNA precursor processing by Dicer, capable of both recovering the majority of known miRNAs present in heterogeneous deep-sequencing samples and reporting novel miRNAs with high confidence. It includes statistical controls that can estimate the true positive rate and the sensibility of miRDeep predictions.(36)

The software can predict the precursor coordinator and the mature seed of the novel miRNAs. Using the miRDeep2 software it was possible to predict five hundred and fourteen novel miRNAs in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis. Of these, a hundred and forty seven had an estimated probability of true positive over 42% and a hundred and nineteen had a significant randfold p-value, (the significance of a novel miRNA precursor structure predicted with software randfold). Of those, twenty-four novel miRNA's had over a hundred read counts. The chr9_57571 and chr18_20516 were the predictions with the higher miRDeep scores (222251,8 and 15073 respectively). The higher the miRDeep score more reliable is the prediction of the novel miRNA. These novel miRNAs can be explored and validated in further studies.

Conclusion

MiRNAs are differently expressed in symptomatic and asyptomatic apical periodontitis and may have an important role in the modulation of these lesions. The miRNA hsa-miR-10a-5p was upregulated in periapical lesions and miRNA hsa-miR-218-5p may be an important target to be explored in symptomatic apical periodontitis.

References

1. Takehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1965;20(3):340-349.
2. Nair P. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *International endodontic journal* 2006;39(4):249-281.
3. Heo SC, Jeon ES, Lee IH, Kim HS, Kim MB, Kim JH. Tumor necrosis factor- α -activated human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing through paracrine mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 2011;131(7):1559-1567.
4. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang L-H, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic acids research* 1982;10(8):2709-2721.
5. Campos K, Gomes CC, Farias LC, Silva RM, Letra A, Gomez RS. DNA methylation of MMP9 is associated with high levels of MMP-9 messenger RNA in periapical inflammatory lesions. *Journal of endodontics* 2016;42(1):127-130.
6. Campos K, Gomes CC, de Fátima Correia-Silva J, Farias LC, Fonseca-Silva T, Bernardes VF, et al. Methylation pattern of IFNG in periapical granulomas and radicular cysts. *Journal of endodontics* 2013;39(4):493-496.
7. Campos K, Fransciconi CF, Okechie V, de Souza LC, Trombone APF, Letra A, et al. FOXP3 DNA methylation levels as a potential biomarker in the development of periapical lesions. *Journal of endodontics* 2015;41(2):212-218.
8. Ordway J, Bedell J, Citek R, Nunberg A, Garrido A, Kendall R, et al. Comprehensive DNA methylation profiling in a human cancer genome identifies novel epigenetic targets. *Carcinogenesis* 2006;27(12):2409-2423.
9. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods* 2001;25(4):402-408.
10. Armenante F, Merola M, Furia A, Palmieri M. Repression of the IL-6 gene is associated with hypermethylation. *Biochemical and biophysical research communications* 1999;258(3):644-647.
11. Nile CJ, Read RC, Akil M, Duff GW, Wilson AG. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2008;58(9):2686-2693.
12. Baccarelli A, Rusconi F, Bollati V, Catelan D, Accetta G, Hou L, et al. Nasal cell DNA methylation, inflammation, lung function and wheezing in children with asthma. 2012.
13. Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell* 1988;53(1):3-4.
14. Ari G, Cherukuri S, Namasivayam A. Epigenetics and Periodontitis: A Contemporary Review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 2016;10(11):ZE07.
15. Hsieh C-S, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12. *Science* 1993;260:547.
16. Thornhill M, Wellicome S, Mahiouz D, Lanchbury J, Kyan-Aung U, Haskard D. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN- γ to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and-independent binding mechanisms. *The Journal of Immunology* 1991;146(2):592-598.

17. Jia X-W, Yuan Y-D, Yao Z-X, Wu C-J, Chen X, Chen X-H, et al. Association between IL-4 and IL-4R Polymorphisms and Periodontitis: A Meta-Analysis. *Disease markers* 2017;2017.
18. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome biology* 2006;7(12):243.
19. Kim P, Dutra AS, Chandrasekharappa SC, Puck JM. Genomic structure and mapping of human FADD, an intracellular mediator of lymphocyte apoptosis. *The Journal of Immunology* 1996;157(12):5461-5466.
20. Alappat EC, Feig C, Boyerinas B, Volkland J, Samuels M, Murmann AE, et al. Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKI α regulates its nonapoptotic activities. *Molecular cell* 2005;19(3):321-332.
21. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of oral microbiology* 2011;3(1):5304.
22. Gutmann JL, Baumgartner JC, Gluskin AH, Hartwell GR, Walton RE. Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states. *Journal of Endodontics* 2009;35(12):1658-1674.
23. Carneiro E, Parolin A, Wichnieski C, Rosa E, Neto US, Westphalen V, et al. Expression levels of the receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin and the number of gram-negative bacteria in symptomatic and asymptomatic periapical lesions. *Archives of oral biology* 2017;73:166-171.
24. Meltzer PS. Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature* 2005;435(7043):745-746.
25. Baltimore D, Boldin MP, O'connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature immunology* 2008;9(8):839-845.
26. Katz MG, Fargnoli AS, Kendle AP, Hajjar RJ, Bridges CR. The role of microRNAs in cardiac development and regenerative capacity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2016;310(5):H528-H541.
27. Schulte C, Westermann D, Blankenberg S, Zeller T. Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in heart failure with preserved and reduced ejection fraction. *World journal of cardiology* 2015;7(12):843.
28. Tili E, Michaille J-J, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *The Journal of Immunology* 2007;179(8):5082-5089.
29. Chen X-M, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282(39):28929-28938.
30. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006;103(33):12481-12486.
31. Gantier MP, Sadler AJ, Williams BR. Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. *Immunology and cell biology* 2007;85(6):458-462.
32. Motedayyen H, Ghotloo S, Saffari M, Sattari M, Amid R. Evaluation of microRNA-146a and its targets in gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology* 2015;86(12):1380-1385.

33. Xia Z, Chen C, Chen P, Xie H, Luo X. MicroRNAs and their roles in osteoclast differentiation. *Frontiers of medicine* 2011;5(4):414-419.
34. Zhong S, Zhang S, Bair E, Nares S, Khan AA. Differential expression of microRNAs in normal and inflamed human pulps. *Journal of endodontics* 2012;38(6):746-752.
35. Bullard JH, Purdom E, Hansen KD, Dudoit S. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC bioinformatics* 2010;11(1):94.
36. Friedländer MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S, et al. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nature biotechnology* 2008;26(4):407-415.
37. Chan LT, Zhong S, Naqvi AR, Self-Fordham J, Nares S, Bair E, et al. MicroRNAs: new insights into the pathogenesis of endodontic periapical disease. *Journal of endodontics* 2013;39(12):1498-1503.
38. Stoecklin-Wasmer C, Guarnieri P, Celenti R, Demmer R, Kebschull M, Papapanou P. MicroRNAs and their target genes in gingival tissues. *Journal of dental research* 2012;91(10):934-940.
39. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007;104(5):1604-1609.
40. Sonkoly E, Ståhle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. In: *Seminars in cancer biology*; 2008: Elsevier; 2008. p. 131-140.
41. He M, Song G, Yu Y, Jin Q, Bian Z. LPS-miR-34a-CCL22 axis contributes to regulatory T cell recruitment in periapical lesions. *Biochemical and biophysical research communications* 2015;460(3):733-740.
42. Lund AH. miR-10 in development and cancer. *Cell death and differentiation* 2010;17(2):209.
43. Huo R, Dai M, Fan Y, Zhou J, Li L, Zu J. Predictive value of miRNA-29a and miRNA-10a-5p for 28-day mortality in patients with sepsis-induced acute kidney injury. *Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University* 2017;37(5):646.
44. Petty RD, McCarthy NE, Le Dieu R, Kerr JR. MicroRNAs hsa-miR-99b, hsa-miR-330, hsa-miR-126 and hsa-miR-30c: potential diagnostic biomarkers in natural killer (NK) cells of patients with chronic fatigue syndrome (CFS)/myalgic encephalomyelitis (ME). *PloS one* 2016;11(3):e0150904.
45. Xie Y-f, Shu R, Jiang S-y, Liu D-l, Zhang X-l. Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues. *International journal of oral science* 2011;3(3):125-134.
46. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Translational Research* 2011;157(4):163-179.
47. Hao Y, Ge Y, Li J, Hu Y, Wu B, Fang F. Identification of MicroRNAs by Microarray Analysis and Prediction of Target Genes Involved in The Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Journal of Periodontology* 2017(0):1-11.
48. Chen L, Ma H, Hu H, Gao L, Wang X, Ma J, et al. Special role of Foxp3 for the specifically altered microRNAs in Regulatory T cells of HCC patients. *BMC cancer* 2014;14(1):489.

49. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell* 2009;136(2):215-233.