



**ANA PAULA OLIVEIRA GIORGETTI BOSSOLAN**

**“Padrão de expressão gênica na área do ligamento  
periodontal durante o desenvolvimento radicular.”**

**PIRACICABA**

**2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**ANA PAULA OLIVEIRA GIORGETTI BOSSOLAN**

**“Padrão de expressão gênica na área do ligamento periodontal  
durante o desenvolvimento radicular.”**

Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr.

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiane Ribeiro Salmon

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À FACULDADE  
DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP,  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM  
CLÍNICA ODONTOLÓGICA NA ÁREA DE PERIODONTIA.

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida  
pela aluna Ana Paula Oliveira Giorgetti Bossolan e orientada  
pelo Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr.

---

Orientador

**PIRACICABA**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

B655p Bossolan, Ana Paula Oliveira Giorgetti, 1980-  
Padrão de expressão gênica na área do ligamento periodontal durante o desenvolvimento radicular / Ana Paula Oliveira Giorgetti Bossolan. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Francisco Humberto Nociti Junior.  
Coorientador: Cristiane Ribeiro Salmon.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Genes. 2. Periodonto. 3. Raiz Dentária. 4. Lasers. 5. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala. I. Nociti Junior, Francisco Humberto, 1967- II. Salmon, Cristiane Ribeiro. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Patterns of gene expression in mouse periodontal ligament during tooth root development

**Palavras-chave em Inglês:**

Genes

Periodontium

Polymerase Chain Reaction

Lasers

High-Throughput Nucleotide Sequencing

**Área de concentração:** Periodontia

**Titulação:** Doutora em Clínica Odontológica

**Banca examinadora:**

Cristiane Ribeiro Salmon

Marcelo Rocha Marques

Carlos Rossa Junior

Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva Gomes

Bruna Rabelo Amorim

**Data da defesa:** 08-02-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 08 de Fevereiro de 2013, considerou a candidata ANA PAULA OLIVEIRA GIORGETTI BOSSOLAN aprovada.

Prof. Dra. CRISTIANE RIBEIRO SALMON

Prof. Dr. MARCELO ROCHA MARQUES

Prof. Dr. CARLOS ROSSA JÚNIOR

Prof. Dra. THAISÂNGELA RODRIGUES LOPES E SILVA GOMES

Prof. Dra. BRUNA RABELO AMORIM

# DEDICATÓRIA

## **Aos meus pais, Roberto e Sueli**

Seus braços sempre se abrem quando preciso de um abraço. Seus corações sabem compreender quando preciso de amigos. Seus olhos sensíveis se endurecem quando preciso de uma lição. O amor de pai e mãe me dirigiu pela vida e me deu as asas que eu precisava para voar. Meu respeito, amor e gratidão!

## **Ao meu irmão, Beto**

Obrigada por não medir esforços para me ajudar e por me admirar. Isso me faz ter mais responsabilidade por servir como exemplo e me faz cada dia tentar ser uma pessoa melhor.

## **Ao meu marido, Renato**

E desde então, sou porque tu és  
E desde então és  
sou e somos...  
E por amor  
Serei... Serás... Seremos...

(Pablo Neruda)

“Ainda na juventude, tornei-me ciente de que um vasto abismo separa os autores de seu público, embora, felizmente para ambos os lados, nenhum deles se dê conta disso. Logo percebi também quão inúteis são todos os prefácios, pois, quanto mais tentamos explicar os nossos propósitos, mais confusão criamos. Além disso, um autor pode escrever um prefácio tão longo quanto desejar, que o público continuará a dirigir-lhe as mesmas cobranças que ele havia procurado afastar.”

Goethe (1830)

“Na ciência as convicções não têm direito de cidadania, é o que se diz com boas razões: apenas quando elas decidem rebaixar-se à modéstia de uma hipótese, de um ponto de vista experimental e provisório, de uma ficção reguladora, pode lhes ser concedida a entrada e até mesmo um certo valor no reino do conhecimento – embora ainda com a restrição de que permaneçam sob vigilância policial, a vigilância da suspeita.”

Nietzsche (1882)

## RESUMO

Considerando-se a hipótese de que os mecanismos envolvidos na regeneração periodontal mimetizam os mecanismos associados com o desenvolvimento original de formação do periodonto, o conhecimento dos princípios biológicos iniciais de formação do periodonto é crucial para o avanço de novas técnicas de bioengenharia envolvidas na regeneração periodontal. No entanto, as mudanças no perfil de expressão gênica durante as fases do desenvolvimento dos tecidos dentais não foram totalmente esclarecidos, principalmente aquelas relacionadas ao desenvolvimento da raiz dos dentes. O estudo de expressão gênica do desenvolvimento radicular ainda é um desafio pela necessidade de desmineralização prévia do tecido que apresenta um maior grau de calcificação quando comparado às fases de desenvolvimento da coroa dental. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar comparativamente o padrão de expressão gênica da bainha epitelial de Hertwig (HERS) e o ligamento periodontal no mesmo período experimental, e o padrão de expressão gênica do ligamento periodontal em diferentes períodos de formação radicular. Foi utilizado um camundongo Swiss Webster por período pós-natal (PN): 13 dias (PN13), 45 dias (PN45), sendo que para o período PN13 a HERS também foi avaliada (PN13 HERS). Após a captura e microdissecção do ligamento periodontal dos primeiros molares nos períodos PN13 e PN45 e das células de HERS do primeiro molar no período PN13, o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) foi realizado para a análise do transcriptoma. Os dados obtidos do sequenciamento foram processados para a filtragem dos “reads” considerados de boa qualidade (>30 na escala “*phred*”). A análise dos resultados mostrou que 587 genes foram diferencialmente expressos na comparação PN13 HERS vs. PN13 sendo que 25 foram diferencialmente expressos para PN13 HERS e 562 para PN13. Também foi mostrado que 768 genes foram diferencialmente expressos na comparação PN13 vs. PN45 e desse total 764 foram diferencialmente expressos para PN13 e 4 para PN45. Quando se comparou os 13 genes identificados para PN13 HERS foi demonstrado que dois deles apresentam papel importante para o desenvolvimento embrionário em camundongos. Para PN13 na comparação com HERS e na comparação

com PN45, verificou-se que 50 e 57 genes foram respectivamente escolhidos. Para PN45, 4 genes ainda não identificados foram escolhidos. No entanto, quando se compara o padrão de expressão gênica nesses períodos estudados, não foram verificadas grandes mudanças. Dessa forma, podemos concluir, dentro dos limites desse estudo, que o padrão de expressão gênica nos diferentes períodos estudados apresenta pouca variabilidade, apesar de apresentar expressão de genes diferentes em cada período.

**Palavras-chave:** Expressão gênica, Ligamento periodontal, HERS, LCM e RNA-Seq.



## ABSTRACT

Considering the hypothesis that the mechanisms involved in periodontal regeneration mimic the mechanisms associated with the development of the original formation of the periodontium, the knowledge of initial biological principles of periodontium development is crucial to the advancement of new bioengineering techniques involved in periodontal regeneration. However, the changes in the gene expression profile during the stages of tooth development remain unclear, mainly the stages related to tooth root development. The study of root development is a challenge because of the need of previous tissue demineralization of this tissue with higher degree of calcification when compared to crown development stages. The aim of the present study was comparatively analyze the gene expression pattern of Hertwig's epithelial root sheath (HERS) and the periodontal ligament at the same experimental period, and also the gene expression pattern of the periodontal ligament at distinct periods of root formation. One Swiss Webster mice per post natal period of 13 days (PN13) and 45 days (PN45) were used. After the laser capture microdissection of the first molar periodontal ligament at PN13 and PN45 and HERS cells of the first molar at PN13, RNA Sequencing (RNA-Seq) was performed for transcriptoma analysis. Data obtained were initially processed to filter the reads considered to have good quality (> 30 at "Phred" score). Data analysis showed that 587 genes were differentially expressed at the comparison PN13 HERS vs. PN13 and of these 25 were differentially expressed at PN13 HERS and 562 at PN13. When comparing PN13 vs. PN45, a total of 768 genes were differentially expressed and of these 764 were differentially expressed at PN13 and 4 genes at PN45. When observing the chosen genes at PN13 HERS, two genes have been shown to have an important role in embryonic development in mice. At PN13, when comparing PN13 HERS vs. PN13, 50 genes were chosen and at the same period PN13, when comparing PN13 vs. PN45, 57 genes were chosen. At PN45, 4 genes were chosen yet unidentified. However, when comparing the gene expression pattern in these periods studied, there were no major changes. Thus, we

can conclude, within the limits of this study, that gene expression pattern in different time periods has little variability, despite showing expression of different genes in each period.

**Key-words:** Gene Expression, Periodontal Ligament, HERS, LCM and RNA-Seq.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>67</b>
	<b>Anexo 1</b> .....	<b>67</b>
	<b>Anexo 2</b> .....	<b>68</b>
	<b>Anexo 3</b> .....	<b>75</b>
	<b>Anexo 4</b> .....	<b>76</b>
	<b>Anexo 5</b> .....	<b>77</b>
	<b>Anexo 6</b> .....	<b>78</b>
	<b>Anexo 7</b> .....	<b>79</b>
	<b>Anexo 8</b> .....	<b>80</b>

<b>Anexo 9.....</b>	<b>81</b>
<b>Anexo 10.....</b>	<b>82</b>
<b>Anexo 11.....</b>	<b>83</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Tendo em vista que um melhor entendimento dos processos biológicos associados com o reparo e a regeneração tecidual é importante para o desenvolvimento de novas terapias clínicas, com o emprego de técnicas celulares e gênicas, que possam servir como alternativas para os tratamentos convencionais destinados à regeneração periodontal, atualmente estão sendo desenvolvidas técnicas para guiar os componentes celulares do periodonto a participarem dos processos regenerativos. Considerando-se que os mecanismos envolvidos na regeneração periodontal podem mimetizar os mecanismos associados com o desenvolvimento original de formação do periodonto (Bartold *et al.*, 2000), o conhecimento dos princípios biológicos iniciais de formação do periodonto é crucial para o avanço de novas técnicas de bioengenharia tecidual envolvidas na regeneração periodontal.

Dessa forma, o conhecimento sobre o desenvolvimento dental, e mais especificamente, o desenvolvimento do periodonto é de grande importância para o novo paradigma de regeneração periodontal baseado em biologia molecular e celular. O desenvolvimento dental, semelhante ao desenvolvimento de outros órgãos, envolve uma série de interações sequenciais e simultâneas entre o epitélio e o ectomesênquima (Thesleff *et al.*, 1995; Pispá & Thesleff, 2003). Durante a embriogênese dos camundongos, por volta do 11º dia de desenvolvimento embrionário, aparece o primeiro sinal de desenvolvimento dental a partir de um espessamento do epitélio oral. Desde então, o epitélio começa a se invaginar no interior do ectomesênquima, derivado da crista neural subjacente, formando progressivamente os botões dentais até o estágio de capuz (Jernvall *et al.*, 1994). Mudanças importantes no desenvolvimento do germe dental iniciam-se no final do estágio de capuz e durante a transição do estágio de capuz para o de campânula, quando acontece a histodiferenciação, em que células epiteliais semelhantes tornam-se distintas morfológica e funcionalmente. O próximo passo no desenvolvimento do dente, ao final do estágio de campânula é caracterizado pela citodiferenciação dessas células em

ameloblastos e odontoblastos que formarão uma dupla camada de células denominada bainha epitelial de Hertwig (HERS – “*Hertwig’s epitelial root sheath*”). Tais células, por fim, são estimuladas (de uma maneira ainda não muito conhecida) para a formação da dentina, cemento (Cox *et al.*, 1992; Linde & Goldberg, 1993; Meikle, 2000; Kim & Simmer, 2007; Bei, 2008; Cáton *et al.*, 2009) e a subsequente formação do ligamento periodontal (Thomas & Kollar, 1988; Thomas & Kollar, 1989) que, segundo Nielsen *et al.* (1980) é onde se encontram as células-chave para a regeneração periodontal.

Alguns estudos sugerem que a expressão de genes durante a formação radicular é significativamente diferente da expressão de genes durante a formação da coroa dental (Dangaria *et al.*, 2009; Tummers & Thesleff, 2009; Huang *et al.*, 2010). No entanto, há mínimas evidências mostrando as similaridades e/ou diferenças na expressão gênica quando se compara o desenvolvimento de coroa vs. raiz, sendo que a maior dificuldade nos estudos que avaliam a porção radicular refere-se ao grau de calcificação dos tecidos nesse estágio de desenvolvimento.

A técnica de captura e microdissecção a laser (LCM – “*Laser Capture Microdissection*”) tem sido utilizada para se analisar o padrão de expressão gênica em diversos tecidos não-mineralizados e em dentes nos estágios iniciais de desenvolvimento quando ainda há uma fraca mineralização. Em pesquisas com tecidos mineralizados ou em dentes em estágios de desenvolvimento mais avançados, ou seja, altamente mineralizados, é necessária a descalcificação prévia, o que torna a preservação de estruturas celulares com alta qualidade de RNA um obstáculo comum. No entanto, é uma técnica que permite o estudo específico de tecidos ou células de interesse sem contaminação de estruturas histológicas não relevantes. Além disso, o LCM proporciona o estudo e o entendimento sobre o transcriptoma presente nos diferentes tecidos, estágios ou sobre diferentes condições e que são essenciais para a interpretação dos elementos funcionais do genoma e a revelação dos constituintes moleculares de células e tecidos em condições de saúde ou doença.

Atualmente, a técnica de sequenciamento de alto rendimento, RNA-Seq (Sequenciamento de RNA) tem sido utilizado como uma ferramenta importante em pesquisa fornecendo um grande número de dados de expressão gênica, ou transcriptoma, de um determinado tecido. A utilização do RNA-Seq tem a vantagem de fornecer resultados de sequenciamento de transcritos ainda não identificados ou conhecidos, o que é limitado por técnicas como o Microarranjo de DNA ou RNA, o qual fornece dados referentes a sondas previamente estabelecidas. Sendo assim, o estudo do transcriptoma dos tecidos dentais durante o desenvolvimento radicular poderá fornecer dados importantes no entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos no desenvolvimento radicular que possam futuramente ser utilizados para modular uma melhor e mais previsível regeneração dos tecidos periodontais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### Formação dental – coroa e raiz

Os camundongos apresentam uma dentição altamente reduzida, sendo que em cada quadrante há um incisivo separado dos 3 molares por uma região de diastema. Esses animais também apresentam somente uma geração de dentes e por serem roedores, os incisivos tem um crescimento contínuo ao longo da vida. Portanto, o estudo da dentição dos camundongos pode nos esclarecer alguns questionamentos sobre a diferença entre incisivos e molares, controle do número de dentes e o papel das células-tronco no desenvolvimento dental. Apesar de a morfologia dental variar entre as espécies, os estágios de formação dental são bem conservados nos vertebrados dentados e pesquisas em camundongos podem fornecer hipóteses sobre o desenvolvimento dental (Streelman *et al.*, 2003).

O desenvolvimento dental, semelhante ao desenvolvimento de outros órgãos, envolve uma série de interações sequenciais e simultâneas entre o epitélio e o ectomesênquima (Thesleff *et al.*, 1995; Pispá & Thesleff, 2003). Durante a embriogênese dos camundongos, por volta do 11º dia de desenvolvimento embrionário, aparece o primeiro sinal de desenvolvimento dental a partir de um espessamento do epitélio oral. Desde então, o epitélio começa a se invaginar no interior do ectomesênquima subjacente, derivado da crista neural, formando progressivamente os botões dentais até o estágio de capuz (Jernvall *et al.*, 1994). Mudanças importantes no desenvolvimento do germe dental iniciam-se no final do estágio de capuz e durante a transição do estágio de capuz para o de campânula, quando acontece a histodiferenciação, em que células epiteliais semelhantes tornam-se distintas morfológica e funcionalmente. O próximo passo no desenvolvimento do dente, ao final do estágio de campânula é caracterizado pela citodiferenciação dessas células em ameloblastos e odontoblastos que formarão uma dupla camada de células denominada bainha epitelial de Hertwig (HERS – “*Hertwig’s epitelial root sheath*”). As



células da HERS migram apicalmente e participam da formação radicular e essa estrutura de bi-camada é formada por uma camada interna e externa de células derivadas do ectoderma. Morfologicamente, HERS é composta de dois tecidos ectomesenquimais: papila dental e folículo dental, como uma estrutura em sanduíche. Durante o desenvolvimento, as células de HERS formam os restos epiteliais de Malassez e também permite que outras células entrem em contato com a superfície externa da dentina. A dupla camada de células da HERS apresenta, pelo menos, dois papéis importantes na formação radicular: biomineralização (formação dentinária e cementogênese) e indução da organização radicular (Owens, 1978; Diekwisch, 2001).

Têm sido notavelmente aceito que HERS é a principal região de controle do desenvolvimento radicular devido ao fato de que essa estrutura desaparece com a completa formação radicular (Hosoya *et al.*, 2008). No entanto, o seu papel e a sua função ainda não estão claros.

### **Transcriptômica**

Transcriptoma ou Transcritoma refere-se ao conjunto completo de transcritos (RNAs mensageiros, RNAs ribossômicos, RNAs transportadores, microRNAs e os RNA não-codificantes) de um dado organismo, órgão, tecido ou linhagem celular. O perfil do transcritoma pode variar de acordo com a fase do ciclo celular, estado fisiológico, estímulos físicos, químicos, biológicos ou doenças (Wang *et al.*, 2009; Van Vliet *et al.*, 2010).

Para o estudo do transcritoma utilizam-se métodos de análise em grande escala como SAGE ("*Serial Analysis of Gene Expression*") denominados como sendo de primeira geração. Recentemente, o método de seqüenciamento em grande escala chamado de "deep sequencing" (microarrays ou microarranjos de cDNA, os microarranjos de oligos e os DNA-chips) foi introduzido no estudo do transcritoma (Bradford *et al.*, 2010) e é denominado de seqüenciamento de segunda geração. Atualmente, as

tecnologias de sequenciamento de alto-rendimento estão sendo mais usadas em biologia e são denominadas de nova geração de sequenciamento. As tecnologias de sequenciamento de nova geração promovem o sequenciamento de DNA e RNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. A técnica de sequenciamento de RNA, conhecida como RNA-Seq faz parte dessa nova geração e não apresenta as limitações das técnicas anteriores, como por exemplo, o conhecimento prévio do organismo estudado requeridos por técnicas como microarranjo e PCR (Wang *et al.*, 2008).

O RNA-Seq consegue, em teoria, capturar praticamente todos os transcritos expressos de uma célula num determinado momento a ser estudado mesmo com pouca quantidade de amostra de RNA extraído e, além disso, está se tornando uma técnica com bom custo-benefício. Essas características mostram a habilidade no fornecimento de complexas, mas mais explicativas informações em relação ao transcriptoma de diversas espécies (Wang *et al.*, 2009; Marguerat & Bahler, 2010).

Sequências do genoma de referência são cruciais para se conduzir estudos com análise de RNA-Seq com acurácia, porque elas fornecem a base para o mapeamento dos “reads” (curtas leituras que se alinham no genoma de referência). Os “reads” são normalmente mapeados contra sequências do genoma ou do transcriptoma e o alinhamento é um passo muito importante para os métodos analíticos. A complexidade dos genomas também pode influenciar a acurácia desse mapeamento, dependendo se são genomas de procariotos ou mamíferos, menores e maiores respectivamente (Chen *et al.*, 2011).

Atualmente, três novas tecnologias de sequenciamento de DNA/RNA já estão disponíveis e foram discutidas em recente publicação científica (Metzker, 2010): 454 Genome Sequencer FLX (Roche Applied Science), Illumina Genome Analyser e SOLiD (Applied Biosystems).

O preparo das bibliotecas nas técnicas de sequenciamento é realizado por fragmentação aleatória do DNA/RNA, seguida por ligação de adaptadores em ambas as extremidades das moléculas. Como cada molécula original é amplificada

independentemente [em microrreatores em PCR (“*Polimerase Chain Reaction*” – Reação em Cadeia da Polimerase) e em clusters independentes na PCR de ponte em fase sólida], a individualidade de cada molécula original se mantém. O que é comum em qualquer uma dessas tecnologias é que os amplicons gerados por PCR são depositados sobre a célula de fluxo, onde ocorrem as reações de sequenciamento, sendo que todos os grupos de moléculas são sequenciados simultaneamente pelos mesmos reagentes que banham a totalidade da célula de fluxo, sendo que cada leitura é individualizada por sua posição na célula de fluxo. Finalmente, o processo de sequenciamento consiste na aquisição de dados por imagem, sendo que as leituras são geradas por interpretação computacional das imagens geradas (Shendure & Ji, 2008).

### **Microarranjo vs. RNA-Seq**

O primeiro trabalho descrevendo a técnica de Microarranjos de DNA foi publicado na revista Science em 1995, no qual foi demonstrado a capacidade da técnica na análise de expressão diferencial de 45 genes de *Arabidopsis thaliana* em diferentes tecidos da planta (Schena *et al.*, 1995). Os anos subsequentes presenciaram uma explosão na aplicabilidade da técnica, destacando-se a produção de um microarranjo representando o transcriptoma completo de *S. cerevisiae* (Lashkari *et al.*, 1997), o qual foi utilizado na análise da expressão gênica deste organismo modelo.

Os microarranjos de DNA/RNA ainda são usados pela maioria dos estudos de transcriptomas. Essa técnica, além de depender de um conhecimento genômico prévio também apresenta um elevado ruído de fundo e sua faixa de detecção de expressão é limitada quando comparada às novas plataformas de sequenciamento (~100 vezes vs. 9.000 vezes) (Marioni *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

O RNA-Seq, diferentemente de métodos baseados em hibridização (Microarranjo e Northern-Blot), não necessita de conhecimento prévio do transcriptoma e, portanto não se limita à avaliação de genes para os quais existam sondas (Wang *et al.*, 2009). Outra vantagem em relação aos microarranjos de DNA é que RNA-Seq apresenta

alta resolução, melhor e maior faixa de detecção e baixa variação técnica (Wilhelm & Landry, 2009). Adicionalmente, o RNA-Seq também apresenta um melhor controle sobre as descobertas falsas devido ao fato do desenvolvimento de melhores métodos estatísticos para a análise dos dados transcriptômicos (Nookaew *et al.*, 2012).

Há, portanto, muitas aplicações que o RNA-Seq pode permitir e que os microarranjos não podem. Como o RNA-Seq permite o acesso direto à sequência, junções entre exons podem ser detectadas sem o conhecimento da estrutura do gene, mudanças em alguns eventos também podem ser detectadas e o conhecimento dos polimorfismos podem estabelecer medidas diretas da expressão de alelos específicos (Malone & Oliver, 2011).

Como as sondas dos microarranjos são desenhadas baseadas em dados genômicos conhecidos, e a intensidade de luz é usada para a avaliação de mais ou menos expressão gênica, os microarranjos perdem a oportunidade de detecção de junções entre exons, polimorfismos e detecção das diferenças dos alelos específicos. Finalmente, como o RNA-Seq promove o acesso direto às sequências, essa técnica pode ser usada em espécies cuja sequência genômica inteira ainda não esteja disponível. A única opção em casos de desconhecimento de genomas inteiros para a técnica de microarranjo seria a hibridização com sondas de outras espécies (Malone & Oliver, 2011).

No entanto, a detecção de genes com baixa expressão permanecerá como um problema para ambas as técnicas, mas há algumas aplicações como a descoberta de transcritos e a identificação de isoformas, em que a escolha da técnica de RNA-Seq pode ser a melhor opção (Malone & Oliver, 2011).

### **3 PROPOSIÇÃO**

1. Avaliar o padrão de expressão gênica entre as células da bainha epitelial de Hertwig e o tecido periodontal em formação no mesmo período experimental.
2. Avaliar o padrão de expressão gênica entre o período inicial de formação do ligamento periodontal e o período de maturação desse mesmo tecido.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados camundongos (Swiss-Webster) adultos, os quais foram acasalados no intuito de se obter animais de segunda geração. Os animais foram mantidos em gaiolas para acasalamento por 12 horas sendo que cada gaiola continha duas fêmeas e um macho. Após a copulação, camundongos fêmeas foram examinadas para a detecção visual do “*plug*” vaginal, cuja presença determinou o início do período gestacional ou dia gestacional 0 (E0). Filhotes da mesma ninhada, machos ou fêmeas, foram sacrificados nos períodos pós-natal (PN) que representam diferentes etapas de formação do ligamento periodontal incluindo PN13 – 13 dias pós-natal (início de formação do ligamento periodontal) e PN45 – 45 dias pós-natal (completa formação da raiz e do ligamento periodontal). Todos os animais foram mantidos no ciclo de 12 horas claro/escuro numa temperatura de aproximadamente 21°C com água e comida fornecidas “*ad libitum*” durante todo o período experimental. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNICAMP N<sup>o</sup> 2101-1 (Anexo 1).

### Preparo das amostras

Um camundongo por período (n=1/período; nTotal = 3) foi sacrificado por meio de deslocamento cervical e as hemimandíbulas foram armazenadas em tubos com nitrogênio líquido até o momento da fixação. O processamento das amostras foi realizado de acordo com protocolo previamente estabelecido no laboratório de Periodontia da FOP (Salmon *et al.*, 2012) (Anexo 2). As amostras foram colocadas em cassetes plásticos, imersas e mantidas no fixador Protocol (formol tamponado a 10%) (Fisher Diagnostics. Midletown, VA, USA) por 2 horas a 4°C. Após, as amostras passaram por três lavagens em solução de tampão fosfato (PBS) 1X (pH 7.4, Ambion/Applied Biosystem) por 30 minutos e

foram então descalcificadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético – EDTA Merck/Millipore) a 20% em tampão fosfato a 0,01M, pH 7.4 e mantidas a 4°C sob agitação constante com três trocas diárias da solução por um período de 15 dias para PN13 e 21 dias para PN45. As hemimandíbulas foram então aparadas mantendo-se a região dos molares, lavadas em PBS, desidratadas em 3 trocas de etanol absoluto por 30 minutos, incubadas em 2 trocas de xilol por 20 minutos, infiltradas em parafina por 2 horas e incluídas em Paraplast (McCormick Scientific). Os blocos foram aparados e armazenados a -20°C até o uso. Cortes longitudinais aos primeiros molares foram seccionados com 7 µm de espessura na direção Mésio-Distal, passados em H<sub>2</sub>O MilliQ tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) a 42°C e colocados em lâminas de vidro com membrana de polietileno naftaleno (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) para captura por microdissecção a *laser* (LCM). As lâminas contendo os cortes (entre 10 a 12 cortes para todos os períodos) foram armazenadas a -70°C por um período máximo de 7 dias antes de serem processadas para a microdissecção a *laser*.

Cuidados extras foram tomados durante a coleta e processamento das amostras neste estudo. Todo o material utilizado foi autoclavado e limpo com RNaseZap (Applied Biosystem, Ambion, Austin, TX, USA) a fim de evitar a contaminação com RNases.

### **Captura por Microdissecção a *laser***

Para a microdissecção a *laser*, as lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas em 2 trocas de xilol (Arcturus Bioscience) por 2 minutos e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol até água, corados por 1 minuto com hematoxilina com *Paradise Plus Staining Solution* (Arcturus Bioscience), desidratados em concentrações crescentes de etanol, secos em temperatura ambiente por 5 minutos e imediatamente microdissecados. A microdissecção a *laser* foi feita em pelo menos 12 cortes para capturar as células do ligamento periodontal (PDL) dos primeiros molares nos períodos PN13 e PN45 e também as células da bainha epitelial de Hertwig (HERS) dos

primeiros molares em PN13. A área de captura do PDL foi delimitada utilizando como referência a junção cimento-esmalte (JEC) e a crista óssea alveolar em formação em todos os períodos, evitando as áreas adjacentes ao osso alveolar e ao cimento para excluir células do tecido ósseo, osteoblastos e osteoclastos, e cementoblastos (Figura 1). As células foram capturadas utilizando uma combinação de “*laser*” infravermelho (IR) e “*laser*” cortante ultravioleta (UV) do equipamento de microdissecção Arcturus XT (Applied Biosystem, Foster City, CA), seguindo os seguintes parâmetros ajustados para a captura da área do PDL e da HERS sobre um aumento de 40x: “*UV cutting speed*” de 100 a 200mm/s; “*IR laser strength*” de 65 a 70mW, “*duration*” de 20ms, “*spot size*” de 20 $\mu$ m. Um tempo controlado de 45 a 60 minutos de microdissecção de cada lâmina foi utilizado. Uma área de aproximadamente 116.115  $\mu$ m<sup>2</sup>, 140.429  $\mu$ m<sup>2</sup> e 5.028  $\mu$ m<sup>2</sup> foi capturada do PDL em PN13 e PN45 e da HERS em PN13, respectivamente (Figura 2).

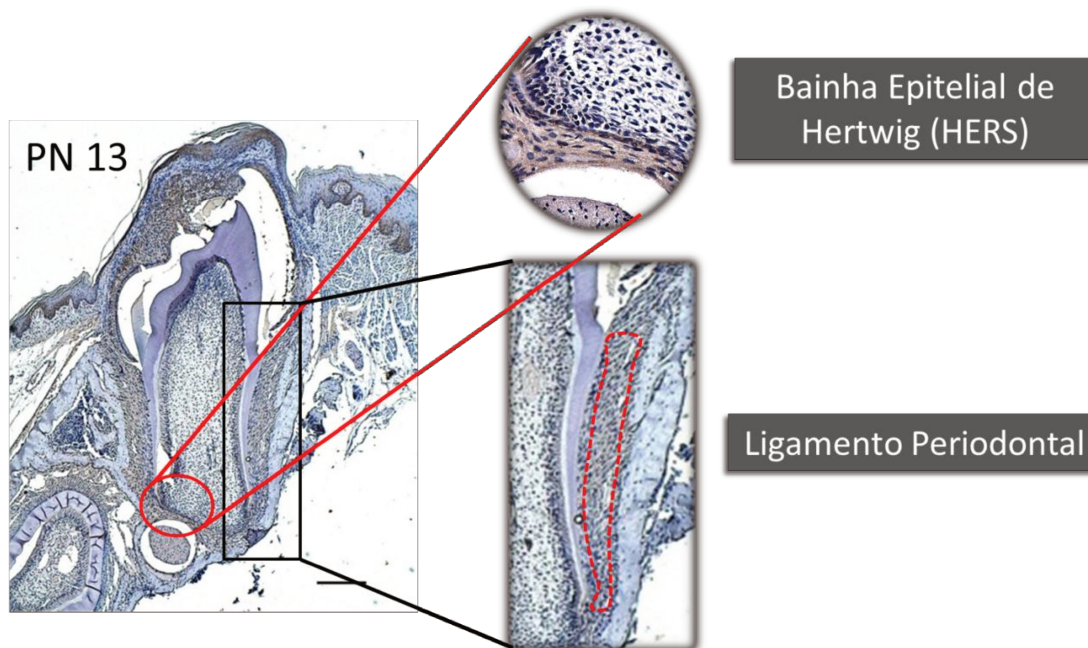


Figura 1: Fotomicrografia de corte histológico de mandíbula de camundongo do período PN13. A fotomicrografia superior aponta para as células da HERS delimitadas pelo círculo vermelho. A



fotomicrografia inferior aponta para o desenho da área do ligamento periodontal a ser microdissecada, delimitada pela linha tracejada vermelha no interior da área delimitada pelo retângulo preto.

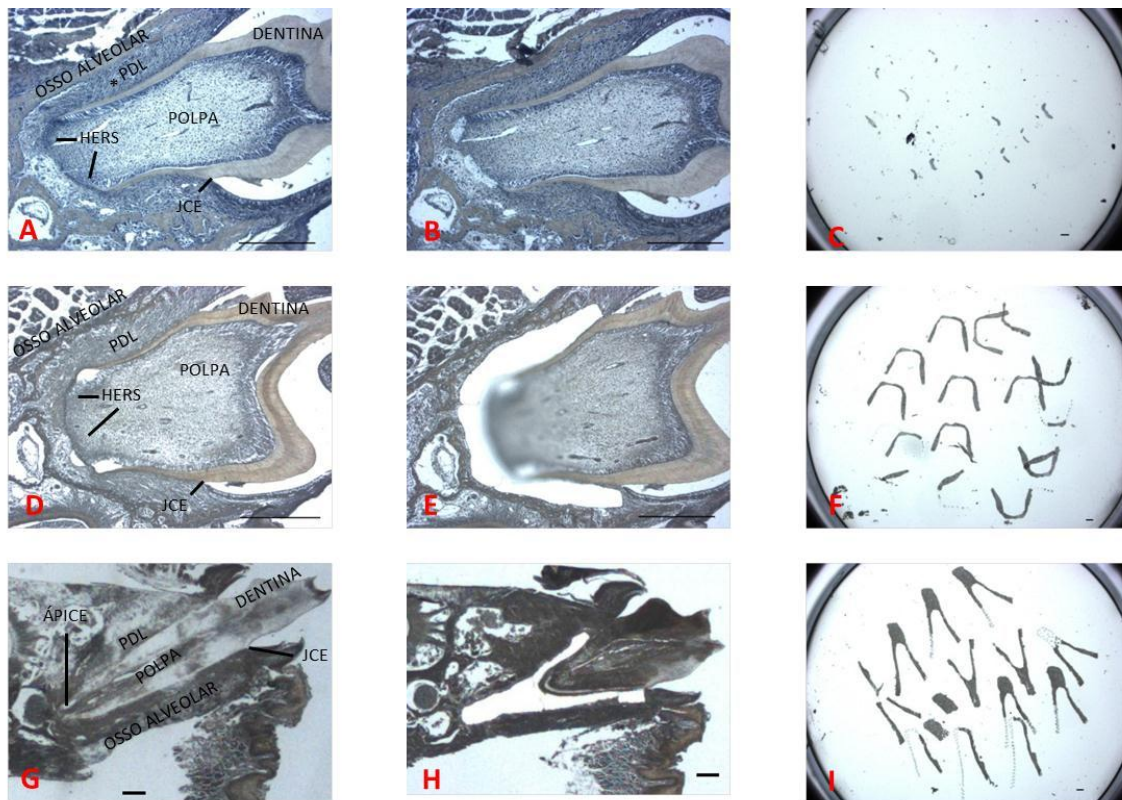


Figura 2: (A e D) Fotomicrografias de cortes histológicos do primeiro molar mandibular anteriormente à da microdissecção a *laser*. (B) corte histológico de PN13 após a microdissecção a *laser* e captura das células da bainha epitelial de Hertwig (HERS). (C) Imagem do “cap” contendo as células da HERS capturadas. (E) corte histológico de PN13 logo após a microdissecção a *laser* e captura do PDL. (F) imagem do “cap” contendo o PDL de PN13 capturado. (G) corte histológico do primeiro molar mandibular no período PN45 anteriormente à captura e microdissecção a *laser*. (H) corte histológico de PN45 após a microdissecção a *laser* e captura do PDL. (I) Imagem do “cap” contendo o PDL de PN45 capturado. Barra = 200µm.

### **Extração e amplificação do RNA e síntese de cDNA**

Os “caps” contendo os tecidos capturados (figura 2C, 2F e 2I) foram transferidos e adaptados a um microtubo de 0,5ml contendo o tampão de lise (Pro-K

Reconstitution Buffer (Applied Biosystems™ by Life Technologies™) do “*kit*” de extração de RNA (Arcturus® Paradise® Plus Reagent System – Applied Biosystems™ by Life Technologies™). O tubo foi vertido para permitir o contato do tampão de lise com o tecido capturado, incubado a 37°C por 16 horas, vortexado para a homogeneização da amostra e brevemente centrifugado.

Para o isolamento do RNA total foi utilizado o “*Kit*” Arcturus® Paradise® Plus Reagent System (Applied Biosystems™ by Life Technologies™), de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase I para se remover traços de DNA genômico contaminante. Após a extração do RNA total, a concentração de RNA das amostras foi avaliada por espectrometria usando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, NC). A integridade do RNA foi avaliada utilizando-se 1µl de cada amostra com o “*kit*” RNA Pico 6000 Labchip no equipamento 2100 Bioanalyzer Expert (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Após a verificação do RIN (Número de integridade do RNA), no qual uma escala de 1 a 10 indicou qualidade de RNA de severamente fragmentado a RNA intacto de alta qualidade, seguiu-se para duas etapas de amplificação do RNA com o “*kit*” Arcturus® Paradise® Plus Reagent System RNA Amplification (Applied Biosystems™ by Life Technologies™) de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 4µg do RNA amplificado e o “*kit*” SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Life Technologies, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

### **Sequenciamento de RNA (RNA-Seq)**

O processo de preparo das amostras para o sequenciamento do RNA (RNA-Seq) foi feito no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) utilizando-se o “*kit*” TruSeq™ RNA Sample Preparation v2 high throughput Kit (Illumina®, Inc., San Diego, CA) a partir da segunda etapa de síntese de cDNA e seguindo as recomendações do fabricante desse momento em diante.

Resumidamente, as moléculas de cDNA das três amostras (PN13 HERS, PN13 e PN45) foram selecionadas por tamanho, amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), passaram pelo reparo das extremidades e pela ligação de adaptadores para hibridização na célula de fluxo e injetadas dentro da célula de fluxo para o início do sequenciamento pela plataforma HiScanSq (Illumina®, Inc., San Diego, CA). Após o sequenciamento, os dados brutos obtidos foram analisados em quatro etapas principais:

Na primeira etapa (obtenção e visualização dos dados brutos) foi utilizado o programa CASAVA 1.8.2 fornecido pela Illumina (Illumina®, Inc., San Diego, CA), que organiza os dados brutos transformando-os em “reads” no formato fastq acompanhados dos índices de qualidade “Phred”. Os “reads” foram visualizados utilizando o programa FastQC ([www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/](http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/)).

A segunda etapa consistiu no pré-processamento dos “reads” e aqueles com qualidade média  $\leq 30$  na escala “phred” foram removidos utilizando os *scripts* de pré-processamento de Smith *et al.* (2011) a fim de evitar artefatos e reduzir o tempo das análises posteriores. Sequências dos “index” e dos “primers” utilizadas na confecção das bibliotecas de cDNA também foram identificadas e removidas com a utilização da ferramenta FASTX-Toolkit, versão 0.0.13 ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)). Foi verificada também a contaminação por rRNA nas amostras utilizando o “pipeline” do programa Agalma (<https://github.com/caseywdunn/agalma>). O “script” utilizado nesse programa mapeia os “reads” contra uma base de dados de RNA ribossomal obtida no “site” do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Também foi analisada a cobertura dos “reads” que é definida como o total de bases sequenciadas dividido pelo tamanho do genoma ( $C = NL/G$ ; onde C é a cobertura, N é o número de “reads” sequenciado, L é a quantidade de pares de base nos “reads” e G é o tamanho do genoma original em pares de base).

A terceira etapa consistiu no alinhamento e análise da expressão diferencial dessas amostras. Utilizando os programas TopHat v.2.0.1 (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>) e

Bowtie v. 0.12.7 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) (Trapnell *et al.*, 2009; Langmead *et al.*, 2009, respectivamente), os “reads” foram mapeados contra o genoma de “*Mus musculus*” v37 da base de dados do NCBI. O programa Tophat alinha esses “reads” gerados com o sequenciamento nos genomas utilizando o Bowtie e com isso identifica as junções de “*splicing*” dos exons transcritos, identificando exons potenciais. Para cada amostra um arquivo no formato *bam* foi gerado contendo o alinhamento em relação ao genoma de referência. Após o alinhamento foi obtida a média de profundidade de cobertura dos dados através do programa Samtools (Li *et al.*, 2009), uma estimativa baseada no número de “reads” mapeados ao longo do genoma de referência.

Os arquivos resultantes do alinhamento foram então agrupados de acordo com os períodos avaliados e a análise de expressão gênica diferencial (número de transcritos diferencialmente expressos) foi realizada pelo pacote Cuffdiff (Trapnell *et al.*, 2010) que faz parte do programa Cufflinks v. 1.3.0 (Trapnell *et al.*, 2010). Foram obtidos os valores de FPKM (fragmentos/quilobase de exon/milhões de fragmentos mapeados), que é uma medida relativa da abundância dos transcritos obtidos através da montagem do transcriptoma. Para cada amostra foi obtida uma média geométrica de expressão, ou seja, média de FPKM, e na comparação par-a-par dos períodos foi obtido um número de “*fold change*”. Esse número obtido através da comparação de um período por outro (por exemplo, PN13 vs. PN45), de valor 1(um) indica duas vezes a diferença de expressão, já que as medidas de “*fold change*” estão em escala de  $\log_2$ . Para a análise estatística, o Teste Exato de Fisher foi utilizado e os transcritos referentes aos genes foram considerados diferencialmente expressos quando seus valores de expressão (FPKM) diferiram por um fator de 1,5 e quando seu valor de *p* corrigido e do FDR (“*false discovery rate*”) eram menores que 0,05. Esse valor corrigido de *p* é também chamado de valor *q* ou *adjp* (“adjusted *p* value”) e pode ser obtido através da função de R no pacote R/Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>). Além disso, o FDR de 0,05 é uma medida controlada pelo procedimento de correção de Benjamini & Hochberg (1995). A visualização gráfica dos resultados foi feita pelo pacote CummeRbund (<http://compbio.mit.edu/cummeRbund/>), através de gráficos de dispersão e “*volcano plots*”,

que permitem verificar a magnitude da expressão diferencial dos genes ou transcritos de modo geral.

Na quarta e última etapa foi realizada a análise das categorias GO (“*Gene Ontology*”) e das vias funcionais KEGG para identificação dos processos biológicos e funções moleculares da rede de genes diferencialmente expressos entre os períodos. Essa identificação (Zhang *et al.*, 2005; Duncan *et al.*, 2010) foi realizada pelo programa WebGestalt – WEB-based Gene Set Analysis Toolkit v2 (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>) com os parâmetros *Gene Id type: mmusculus\_Ensemble\_gene\_stable\_id*, *Reference Set: mmusculus genome*, *Statistical Method: Hypergeometric*, *Multiple Test Adjustment: BH*, *Significance Level: top 10*, *Minimum number of genes for a category: 2*. O teste de enriquecimento empregado foi o Hipergeométrico, seguido da correção de Benjamini & Hochberg (1995). Uma vez identificadas e anotadas, as relações entre essas proteínas e suas funções são visualizadas através dos gráficos acíclicos direcionados (DAG), que permitem determinar quais termos GO estão sendo diferencialmente expressos em um determinado conjunto de genes.

## 5 RESULTADOS

### Qualidade das amostras de RNA

Usando o protocolo descrito em Material e Métodos (Extração do RNA), foi obtido o número de integridade das amostras de RNA em dois momentos cruciais: logo após a extração do RNA da amostra capturada por LCM e também após a amplificação desse RNA extraído, anteriormente ao processo de preparo das amostras para o RNA-Seq. O RIN de cada amostra é demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Índice de Integridade do RNA

Amostra	RIN I	RIN II
PN13 HERS	2.30	2.30
PN13	2.30	2.30
PN45	2.30	2.20

Tabela 1: Demonstração do RIN das amostras PN13 HERS, PN13 e PN45 em duas etapas. RIN I = após a extração do RNA e RIN II = após a amplificação do RNA extraído.

### Sequenciamento de RNA

Foram avaliadas as amostras obtidas de 3 animais da mesma ninhada em diferentes períodos de sacrifício (amostras PN13 HERS, PN13 e PN45). As amostras foram corridas em uma única pista da célula de fluxo da plataforma HiScanSq (Illumina, Inc., San Diego, CA) resultando em aproximadamente 35 – 38 milhões de “reads”/amostra (Tabela 2). Foi realizada a filtragem desses “reads” iniciais que estavam com aproximadamente 100 pares de base para a remoção de aproximadamente 25 pares de base das extremidades e após esse pré-processamento, os “reads” com qualidade média  $\leq 30$  na

escala “phred” (Figura 3 mostra um exemplo do índice de qualidade na escala “phred”. Nesse exemplo, o “read” observado apresenta qualidade > 30) foram removidos, o que resultou num total de 5 – 8 milhões de “reads”/amostra com uma média de 75 pares de base (pb) por amostra. Isso corresponde a mais de 19 milhões de “reads” para todas as amostras. Também foi observado que houve um pequeno número de contaminantes como rRNA (RNA ribossômico) e a cobertura do mapeamento desses “reads” sobre o genoma de “Mus Musculus” está exposta na Tabela 2.

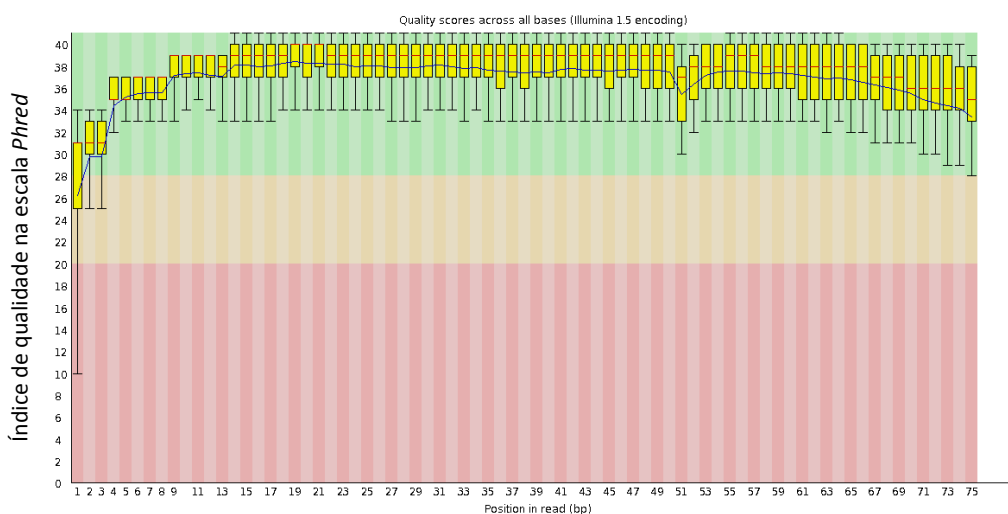


Figura 3: Demonstração do índice de qualidade (FastQC) através de um exemplo da amostra PN13 HERS. Para os “reads” de todas as amostras após o pré-processamento, a média do índice de qualidade estava  $\geq 30$  na escala “phred”.

Tabela 2: Análise do pré-processamento e cobertura dos reads

Amostra	Nº reads inicial	após pré-processamento	Nº de fragmentos de rRNA	% de reads usada no mapeamento	Cobertura
PN 13 HERS	37139470	6609414	1	16,8	2,68
PN 13	38135844	5083424	5	8,3	2,48
PN 45	35654604	8019382	0	22,5	2,02

Tabela 2: Número total de “reads” brutos (nº de “reads” inicial) que foram fornecidos pelo programa CASAVA 1.8.2 após o RNA-Seq. Após o pré-processamento, a porcentagem desses “reads” utilizada para a etapa seguinte de mapeamento genômico está exposta na 5ª coluna (TopHat v.2.0.1 e Bowtie v. 0.12.7) e a cobertura por amostra está demonstrada na última coluna.

### **Alinhamento e Mapeamento**

Os “reads” filtrados das 3 amostras sequenciadas foram alinhados contra o genoma de “*Mus musculus*” v37 da base de dados do NCBI e uma média de 15,8% (Tabela 2) desses “reads” puderam ser mapeados. Além disso, a profundidade de cobertura desse alinhamento, ou seja, o número de “reads” mapeado ao longo do genoma de referência apresentou uma média de 2,39 para todas as amostras (Tabela 2). Após o alinhando e mapeamento, foram eliminados dos dados os genes não alinhados, genes identificados como “low data” e “notest”.

### **Análise de expressão diferencial**

A expressão gênica pareada foi avaliada entre os períodos estudados, ou seja, foram realizadas comparações entre PN13 HERS vs. PN13 e PN13 vs. PN45. Os resultados mostraram um total de 3328 genes identificados na comparação PN13 HERS vs. PN13. Oitenta genes estavam presentes exclusivamente em PN13 HERS e 720 genes foram identificados exclusivamente em PN13. Além disso, dos 2528 genes presentes nos dois períodos, 587 foram diferencialmente expressos, sendo que 25 desses genes foram diferencialmente expressos para o período PN13 HERS e 562 foram diferencialmente expressos para PN13 (Figura 4). Na comparação PN13 vs. PN45, de um total de 3084 genes, 504 genes estão presentes exclusivamente em PN13 e 79 genes estão presentes exclusivamente em PN45. Além disso, dos 2501 genes presentes nos dois períodos, 768 foram diferencialmente expressos, sendo que 764 desses genes foram diferencialmente expressos para o período PN13 e 4 foram diferencialmente expressos para PN45 (Figura 5). As figuras 6 e 7 (A e B) representam graficamente a tendência do total de genes sendo esses diferencialmente expressos ou não para as comparações descritas acima.



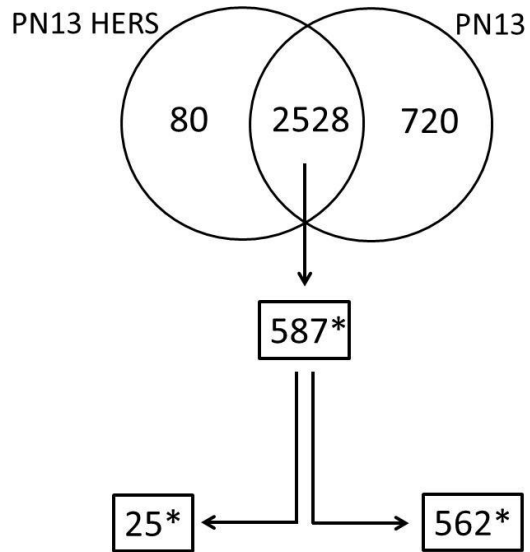


Figura 4: Diagrama de Venn mostrando a distribuição de um total de 3328 genes mapeados para a comparação PN13 HERS vs. PN13. (\* diferencialmente expressos;  $q \leq 0,05$ ).

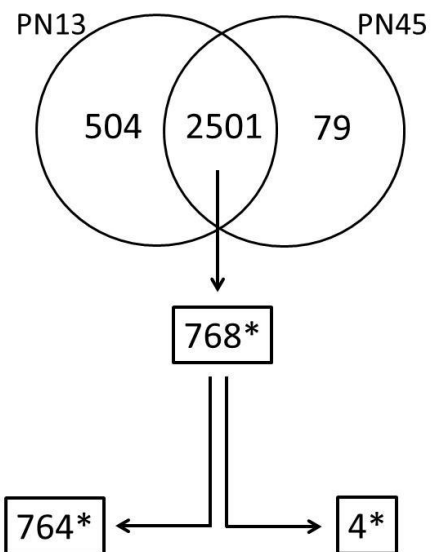


Figura 5: Diagrama de Venn mostrando a distribuição de um total de 3084 mapeados para a comparação PN13 vs. PN45. (\* diferencialmente expressos;  $q \leq 0,05$ ).

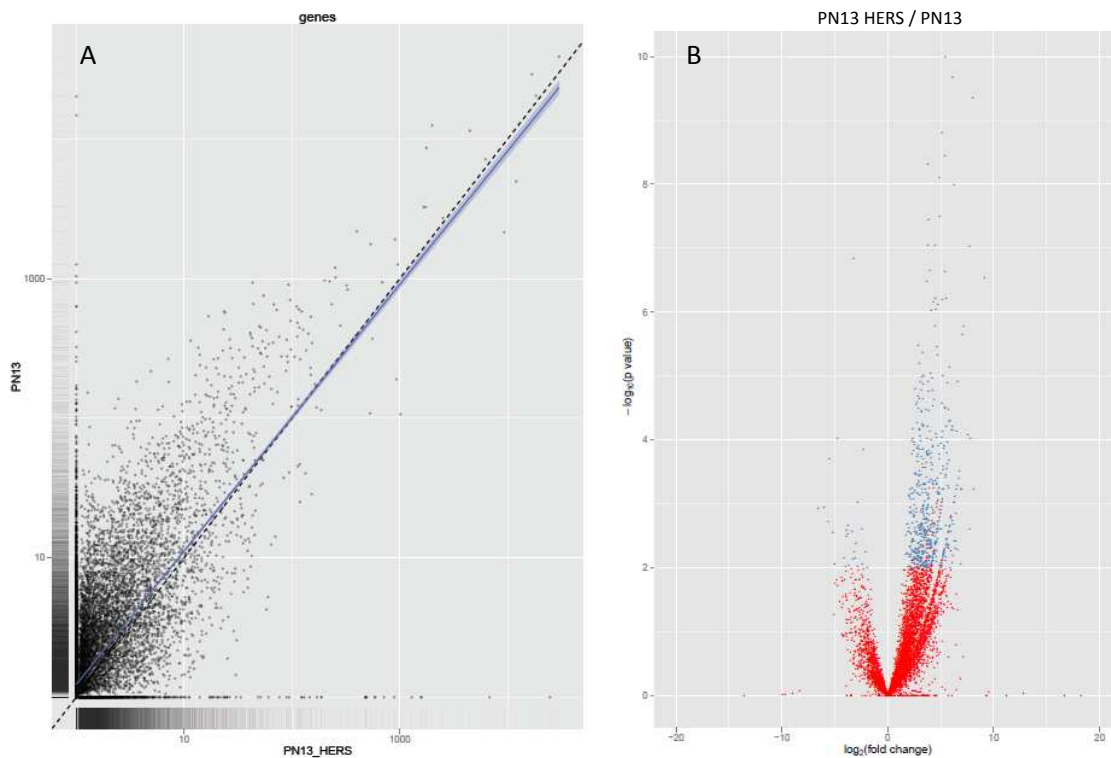


Figura 6: Representação gráfica do total de genes identificados com o mapeamento para a comparação entre os períodos PN13 HERS vs. PN13. Em A, um gráfico de dispersão demonstra a tendência da maioria dos genes expressos nessa comparação para o período PN13. Em B, um gráfico tipo “volcano” demonstra que a maioria dos genes expressos tende para PN13 e ainda mostra aqueles genes que foram diferencialmente expressos.

- genes sem diferença de expressão ( $p \geq 0,05$ )
- genes diferencialmente expressos ( $p \leq 0,05$ )

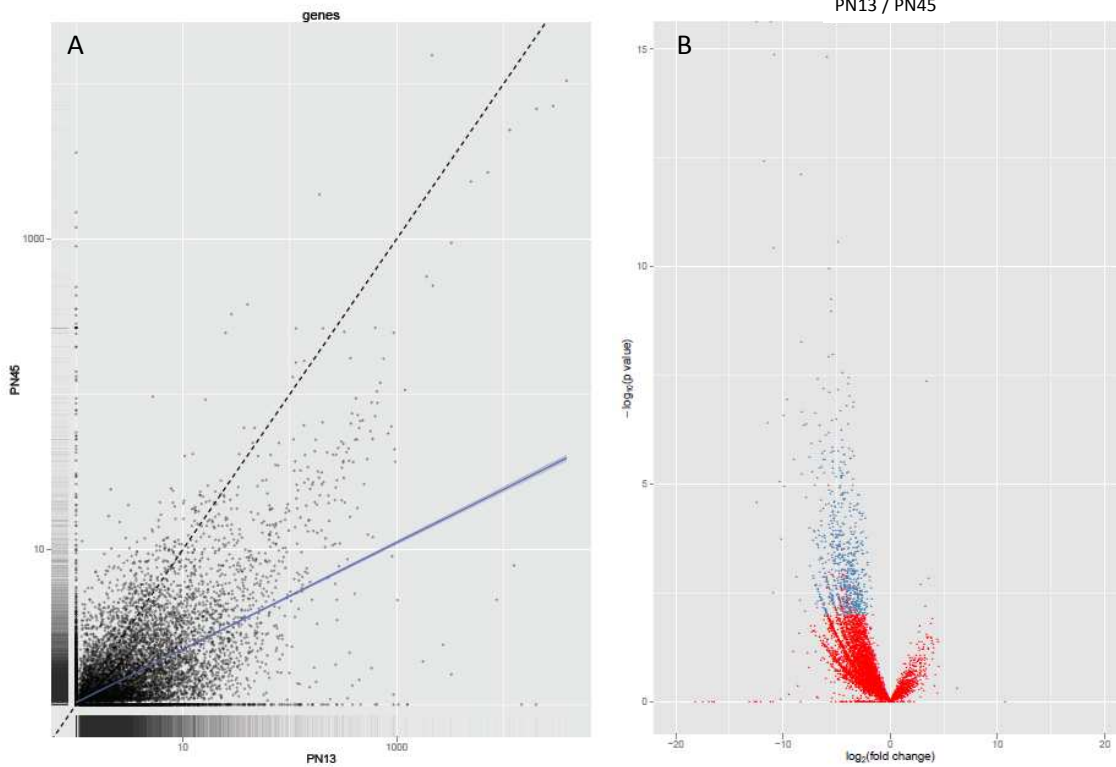


Figura 7: Representação gráfica do total de genes identificados com o mapeamento para a comparação entre os períodos PN13 vs. PN45. Em A, um gráfico de dispersão demonstra a tendência da maioria dos genes expressos nessa comparação para o período PN13. Em B, um gráfico tipo “volcano” demonstra que a maioria dos genes expressos tende para PN13 e ainda mostra aqueles genes que foram diferencialmente expressos.

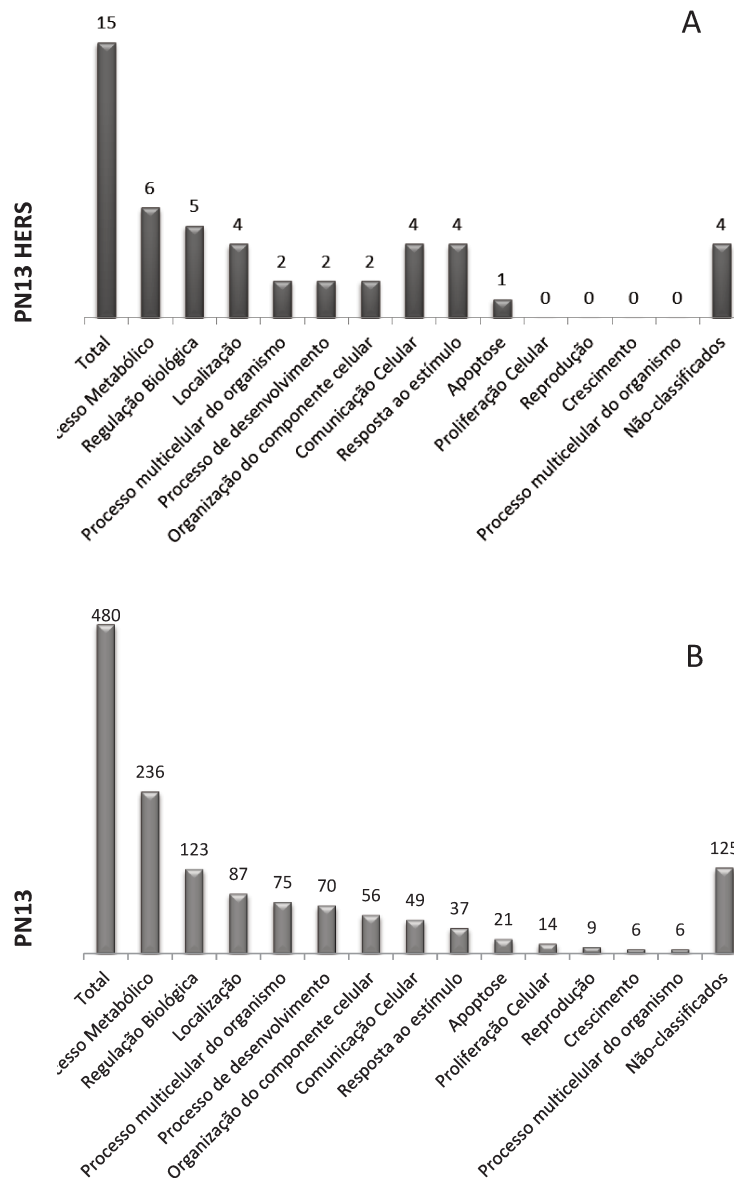
- genes sem diferença de expressão ( $p \geq 0,05$ )
- genes diferencialmente expressos ( $p \leq 0,05$ )

## **Análise de enriquecimento das categorias de Ontologia Gênica (GO) de genes diferencialmente expressos**

Associações funcionais das mudanças na expressão gênica dos períodos estudados foram verificadas para a identificação dos processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares através do programa WebGestalt. A análise de GO (enriquecimento das categorias funcionais) foi realizada para os genes diferencialmente expressos identificados em ambos os períodos. DAG são gráficos acíclicos direcionados que demonstram possíveis vias metabólicas presentes nas amostras avaliadas (Anexos 3 a 11. Genes diferencialmente expressos =  $\text{adjp} \leq 0,05$  = valor de p ajustado para múltiplos testes - Teste Hipergeométrico). Além disso, a análise de enriquecimento das categorias funcionais também forneceu gráficos de barras que representam mais especificamente a distribuição dos genes dentro das suas funções. Os genes foram categorizados a partir dos genes diferencialmente expressos nas análises comparativas. Para a comparação PN13 HERS vs. PN13, dos 25 genes diferencialmente expressos em PN13 HERS, 15 genes foram separados nas categorias e o restante foi identificado como genes não mapeados para os quais nenhuma categorização foi identificada. Ainda para a comparação PN13 HERS vs. PN13, de 562 genes diferencialmente expressos em PN13, 480 foram separados nas categorias. Na comparação PN13 vs. PN45, de 764 genes diferencialmente expressos em PN13, 655 foram separados nas categorias. A avaliação dos genes diferencialmente expressos nos períodos avaliados (PN13 HERS vs. PN13 e PN13 vs. PN45) para a categoria Processo Biológico (Figuras 8 A, B e C) mostrou que todas as amostras apresentaram um padrão similar de distribuição nas sub-categorias, sendo que um número maior de genes estava relacionado com Processo Metabólico e Regulação Biológica. A análise da categoria Função Molecular (Figura 9 A, B e C) também mostrou um padrão similar de distribuição entre as amostras, sendo que a maioria dos genes estava distribuída nas sub-categorias Ligação de Proteínas, Ligação de Íons e Ligação de Nucleotídeos. A análise de GO para a categoria Componente Celular (Figura 10 A, B e C) dos genes diferencialmente em PN13 HERS na comparação entre PN13 HERS vs. PN13 mostrou que a maioria dos genes estava

relacionada à localização na Membrana Celular e Mitocôndria, enquanto os genes diferencialmente expressos em PN13 para a mesma comparação estavam relacionados à localização em Membrana, Núcleo e Complexo Macromolecular. Como apenas 4 genes foram diferencialmente expressos no período PN45 e esses genes ainda são desconhecidos, não foi possível se fazer a análise de enriquecimento para esse período determinado.

PN13 HERS vs PN13



PN 13 vs PN45

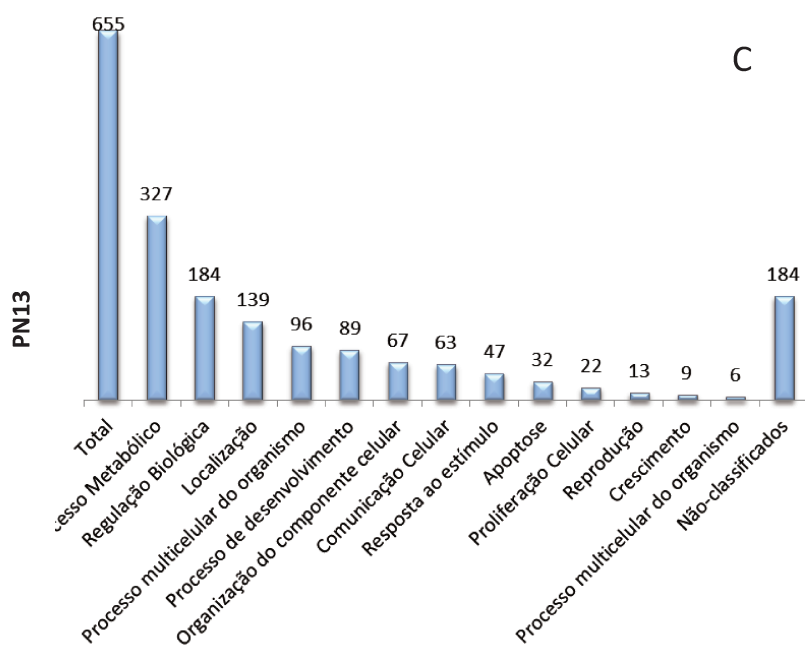
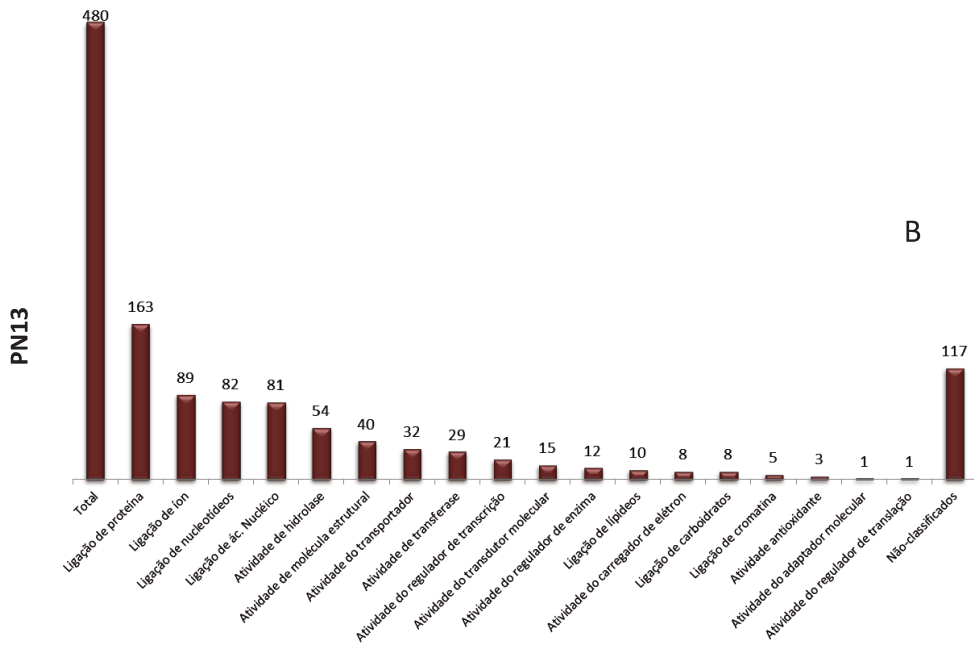
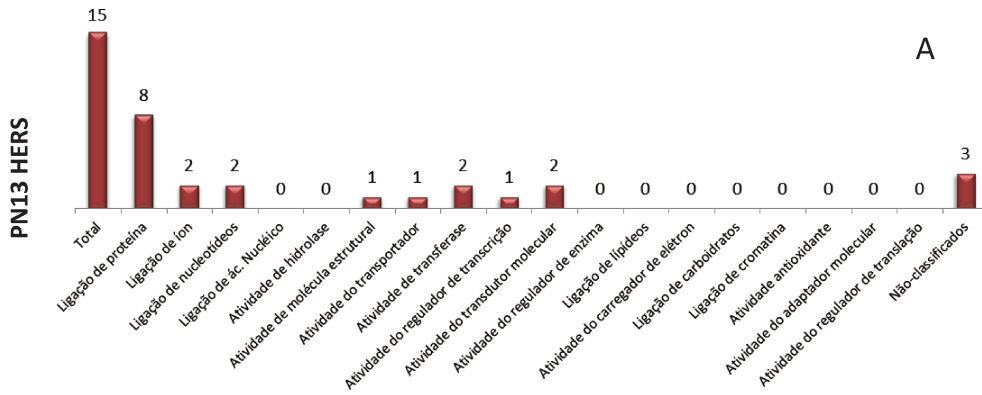


Figura 8: Gráfico da Categoria Processo Biológico fornecido pelo programa WebGestalt. No eixo x estão representadas as sub-categorias e no eixo y o número de genes que foram categorizados a partir dos genes diferencialmente expressos. Em (A), análise comparativa PN13 HERS X PN13, genes diferencialmente expressos em PN13 HERS. (B), PN13 HERS X PN13, genes diferencialmente expressos em PN13. (C) PN13 X PN45, genes diferencialmente expressos em PN13.

PN13 HERS vs PN13



PN 13 vs PN45

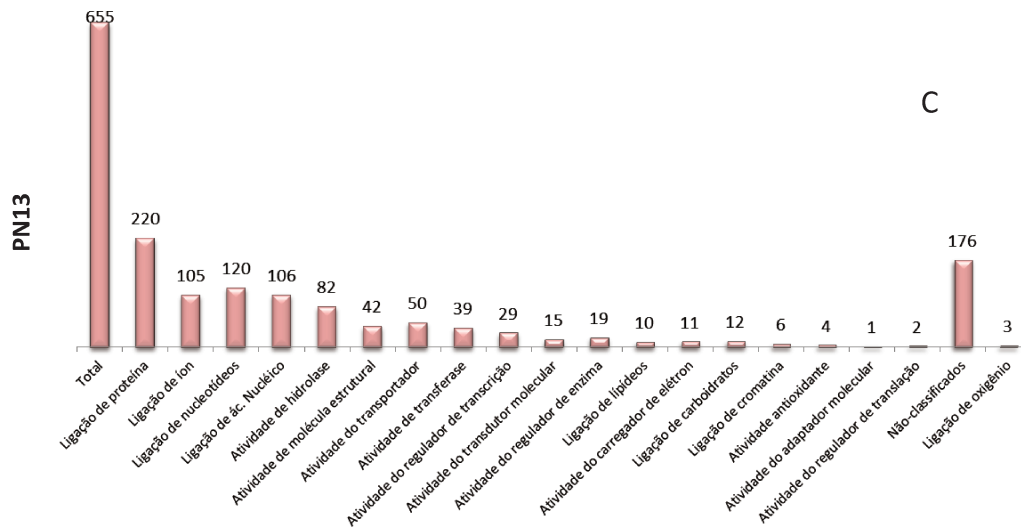
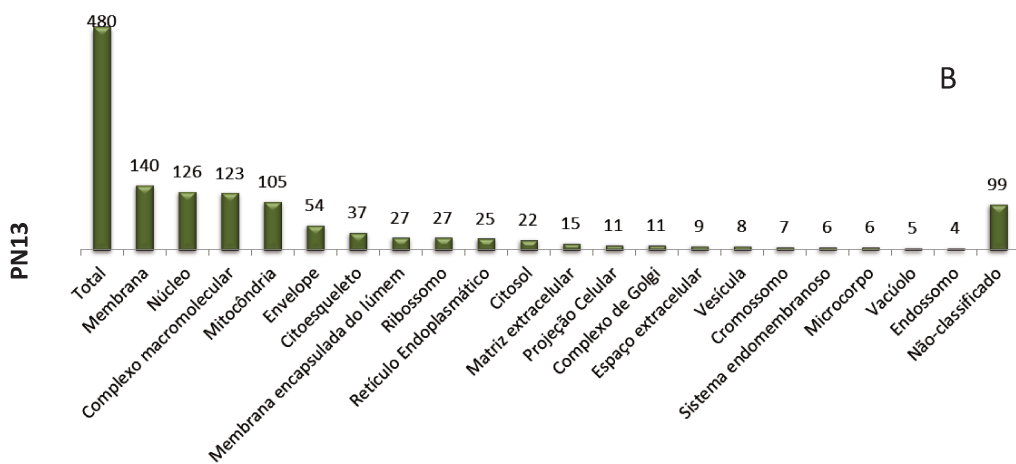
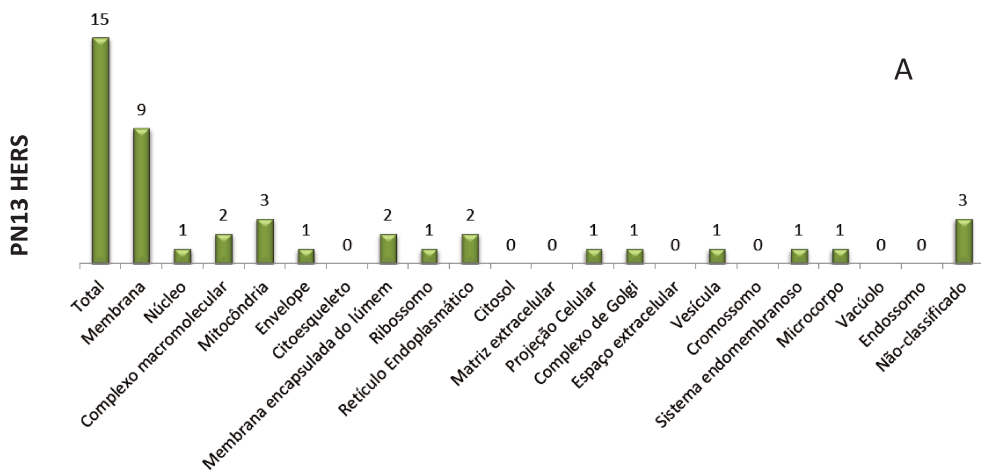


Figura 9: Gráfico da Categoria Função Molecular fornecido pelo programa WebGestalt. No eixo x estão representadas as sub-categorias e no eixo y o número de genes que foram categorizados a partir dos genes diferencialmente expressos. Em (A), análise comparativa PN13 HERS X PN13, genes diferencialmente expressos em PN13 HERS. (B), PN13 HERS X PN13, genes diferencialmente expressos em PN13. (C) PN13 X PN45, genes diferencialmente expressos em PN13.



### PN13 HERS vs PN13



PN 13 vs PN45

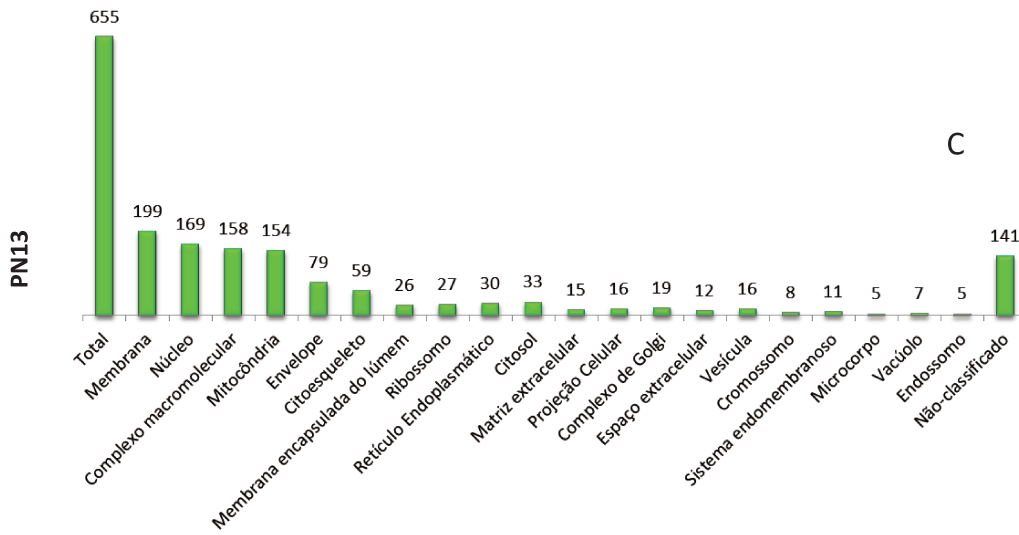


Figura 10: Gráfico da Categoria Componente Celular fornecido pelo programa WebGestalt. No eixo x estão representadas as sub-categorias e no eixo y o número de genes. No eixo x estão representadas as sub-categorias e no eixo y o número de genes que foram categorizados a partir dos genes diferencialmente expressos. Em (A), análise comparativa PN13 HERS X PN13, genes diferencialmente expressos em PN13 HERS. (B), PN13 HERS X PN13, genes diferencialmente expressos em PN13. (C) PN13 X PN45, genes diferencialmente expressos em PN13.

Após o enriquecimento de GO, também foi realizada a análise das vias de sinalização biológicas (KEGG) dos genes diferencialmente expressos para as comparações PN13 HERS vs. PN13 e PN13 vs. PN45 (Tabelas 3, 4 e 5). Como resultado desta análise, em todas as amostras diferencialmente expressas nas comparações, o maior número de genes estava relacionado à via de sinalização metabólica. Em PN13 HERS, a partir de um número inicial de 25 genes diferencialmente expressos, somente 2 genes foram categorizados nesta via. Para PN13, na comparação entre PN13 HERS vs. PN13, nos

chamou a atenção a presença de 9 genes relacionados a via de sinalização de interação de receptores de matriz extracelular.

Tabela 3: Vias de sinalização biológica (KEGG) PN13 HERS vs. PN13 (HERS\*)

Via de Sinalização	Nº de genes	Adj p
Metabólica	2	0,0356

Tabela 3: Representação do enriquecimento KEGG da quantidade de genes presentes nas vias de sinalização biológicas na comparação dos períodos PN13 HERS vs. PN13 para os genes diferencialmente expressos em PN13 HERS\*. (Adj p  $\leq$  0,05 = diferencialmente expresso). Adj p = adjusted p corresponde ao valor de p ajustado para múltiplos testes - Teste Hipergeométrico).

Tabela 4: Vias de sinalização biológica (KEGG) PN13 HERS vs. PN13 (PN13\*)

Via de Sinalização	Nº de genes	Adj p
Metabólica	62	8,95E-30
Doença de Huntington	35	1,41E-32
Doença de Parkinson	34	4,08E-35
Doença de Alzheimer	33	3,98E-28
Fosforilação Oxidativa	32	2,78E-33
Ribossomal	26	3,86E-28
Adesão Focal	16	1,16E-10
Contração Muscular Cardíaca	12	6,02E-11
Ciclo Citrato (Ciclo TCA)	11	5,50E-15
Interação receptor ECM	9	1,93E-07

Tabela 4: Representação do enriquecimento KEGG da quantidade de genes presentes nas vias de sinalização biológicas na comparação dos períodos PN13 HERS vs. PN13 para os genes diferencialmente expressos em PN13\*. (Adj p  $\leq$  0,05 = diferencialmente expresso). Adj p = adjusted p corresponde ao valor de p ajustado para múltiplos testes – Teste Hipergeométrico).

Tabela 5: Vias de sinalização biológica (KEGG) PN13 vs. PN45 (PN13\*)

Via de Sinalização	Nº de genes	Adj p
Metabólica	86	7,09E-42
Doença de Huntington	48	3,37E-45
Fosforilação Oxidativa	47	5,20E-51
Doença de Parkinson	46	2,21E-48
Doença de Alzheimer	46	1,01E-39
Contração Muscular Cardíaca	22	8,95E-23
Ribossomal	20	1,00E-16
Adesão Focal	18	1,59E-10
Ciclo Citrato (Ciclo TCA)	14	7,83E-19
Proteossômica	12	1,20E-12

Tabela 5: Representação do enriquecimento KEGG da quantidade de genes presentes nas vias de sinalização biológicas na comparação dos períodos PN13 vs. PN45 para os genes diferencialmente expressos em PN13\*. (Adj p  $\leq$  0,05 = diferencialmente expresso). Adj p = adjusted p corresponde ao valor de p ajustado para múltiplos testes – Teste Hipergeométrico).

### **Diferenças nos níveis de expressão gênica entre os períodos associados com a formação radicular.**

Entre os genes diferencialmente expressos ( $q \leq 0,05$ ) nas comparações PN13 HERS vs. PN13 e PN13 vs. PN45, foi realizada a seleção de 124 genes de interesse após o estudo de suas funções descritas na literatura (PubMed - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), e considerando os genes que apresentaram “*fold change*”  $\geq 2$ . Foram investigados os estudos científicos relacionados sobre o envolvimento desses genes com a formação do ligamento periodontal ou com a bainha epitelial de Hertwig, bem como com as estruturas adjacentes. Esses dados estão dispostos nas tabelas 6, 7, 8 e 9. Características como Ensemble ID, símbolo do gene, FPKM,  $\text{Log}_2$  *fold change* e o valor de  $q$  estão dispostas nessas tabelas. Observou-se que houve um maior número de genes diferencialmente expressos presentes no período PN13 tanto na comparação PN13 HERS vs. PN13 quanto na comparação PN13 vs. PN45. Os genes escolhidos de acordo com a literatura seguiu o

seguinte critério: genes relacionados com a matriz extracelular, fatores de crescimento, ligação de cálcio, moléculas transmembranas e enzimas. Dessa forma, observou-se que para o período PN13 HERS (tabela 6), apesar de os genes terem sido escolhidos quando “*fold change*”  $\geq 2$ , avaliando-se a literatura, apenas 2 deles fazem parte dos critérios definidos acima que são os genes *Lingo 2* e *Itga8*.

Para PN13 na comparação PN13 HERS vs. PN13, 50 genes apresentaram “*fold change*”  $\geq 2$  e estavam presentes em um dos critérios acima. Resumidamente, os genes *Col1a1*, *Col1a2*, *Col4a1*, *Col6a1*, *Col6a2* e *Col6a3* são genes colágenos e fazem parte da matriz extracelular. Outros genes como *Lamc1*, *Lasp1*, *Lum*, *Pnn*, *Postn*, *Dcn*, *Sparc*, *Vim* e *Calu* também fazem parte da matriz extracelular. Genes como *S100a6* e *Smoc2* são genes que participam da ligação de cálcio com seus receptores na célula. Os genes *Grb10*, *Igf1*, *Igf2*, *Igfbp5* e *Igfbp7* são genes considerados fatores de crescimento. Os genes *Sod1*, *Camk2b*, *Prkar1a*, *Prkaca* estão relacionados com enzimas e os genes *Itgb1* e *Tmem158* estão relacionados com moléculas transmembranas.

Para PN13 na comparação PN13 vs. PN45, 57 genes apresentaram *fold change*  $\geq 2$  e estavam presentes em um dos critérios acima. Resumidamente, os genes *Col1a2*, *Col3a1*, *Col4a1*, *Col5a3*, *Col6a1*, *Col6a2*, *Col15a1*, *Pcolce*, são genes colágenos e fazem parte da matriz extracelular. Outros genes como *Mgp*, *Lum*, *Vcl* e *Dcn* também fazem parte da matriz extracelular. Genes como *S100a16* e *Smoc2* são genes que participam da ligação de cálcio com seus receptores na célula. Os genes *Igfbp7*, *Vegfa*, *Igfbp5*, *Igf2*, *Egfl7*, *Pdgfa*, *Grb10* e *Hdgf* são genes considerados fatores de crescimento. Os genes *Sod1*, *Lcmt1*, *Csnk1d*, *Ctdsp1*, *Vcp*, *Prkar1a*, *Mbtps1* estão relacionados com enzimas e os genes *Itgb1* e *Lamp1* estão relacionados com moléculas transmembranas.

Para a confirmação dos resultados de expressão diferencial dos genes selecionados, outros experimentos complementares utilizando as técnicas de reação em cadeia da polimerase (qPCR) e imunohistoquímica e/ou imunofluorescência serão realizados para a validação dos achados mais significativos.

Tabela 6: 13 genes diferencialmente mais expressos na comparação PN13 HERS x PN13 (PN13 HERS\*)

Ensemble ID	Gene	FPKM HERS	FPKM PN13	Log2 (fold change)	Valor q
ENSMUSG00000059921	Unc5c	5,73	0,06	-6,59736	0,01447
ENSMUSG00000028708	Mknk1	29,12	0,44	-6,03438	0,01398
ENSMUSG00000026768	Itga8	4,87	0,10	-5,67145	0,01971
ENSMUSG00000054871	Tmem158	6,22	0,34	-4,17727	0,04111
ENSMUSG00000093503	Vmn2r-ps4	10,29	0,63	-4,02325	0,04887
ENSMUSG00000045083	Lingo2	4,61	0,30	-3,96069	0,02374
ENSMUSG00000035392	Dennd1a	13,45	0,97	-3,80011	0,02553
ENSMUSG00000074892	B3galt5	5,54	0,42	-3,71474	0,04775
ENSMUSG00000091468	Vmn2r82	7,97	0,75	-3,41102	0,02397
ENSMUSG00000028386	Slc46a2	9,88	1,21	-3,02626	0,03126
ENSMUSG00000035236	Scai	37,90	5,10	-2,89479	0,04872
ENSMUSG00000024579	Pcyox1l	34,51	4,66	-2,88913	0,01264
ENSMUSG00000041592	Sdk2	13,86	2,59	-2,42045	0,04609

Tabela 6: FPKM = fragmentos/quilobase de exon/milhões de fragmentos mapeados (média geométrica de expressão). Log<sub>2</sub> "fold change" = indica a diferença de expressão. Valor de q ≤ 0,05 = genes diferencialmente expressos.

Tabela 7: 50 genes diferencialmente mais expressos na comparação PN13 HERS x PN13 (PN13\*)

Ensemble ID	Gene	FPKM HERS	FPKM PN13	Log2 (fold change)	Valor q
ENSMUSG00000031239	Itm2a	0,31	40,27	7,0273	0,00021
ENSMUSG00000029152	Ociad1	0,39	33,26	6,4226	0,02985
ENSMUSG00000001119	Col6a1	0,13	10,34	6,3331	0,03426
ENSMUSG00000020241	Col6a2	0,11	8,22	6,2380	0,01250
ENSMUSG00000020612	Prkar1a	1,99	83,80	5,3972	0,00000
ENSMUSG00000026478	Lamc1	0,38	15,54	5,3544	0,03598
ENSMUSG00000038366	Lasp1	0,29	11,35	5,2931	0,00357
ENSMUSG00000031987	Egln1	0,15	5,64	5,2727	0,00937
ENSMUSG00000025809	Itgb1	0,13	4,88	5,1877	0,04034
ENSMUSG00000020048	Hsp90b1	0,48	15,53	5,0179	0,01240
ENSMUSG00000032231	Anxa2	0,76	20,59	4,7599	0,01007
ENSMUSG00000038615	Nfe2l1	0,29	6,42	4,4654	0,03113
ENSMUSG00000008136	Fhl2	0,35	7,32	4,3929	0,03575
ENSMUSG00000036446	Lum	0,77	14,40	4,2317	0,00785
ENSMUSG00000017615	Tnfaip1	0,36	6,25	4,1256	0,03348
ENSMUSG00000020994	Pnn	0,30	5,06	4,0976	0,02100
ENSMUSG00000027447	Cst3	3,49	58,74	4,0737	0,00520
ENSMUSG00000048126	Col6a3	0,71	11,61	4,0241	0,02110
ENSMUSG00000005469	Prkaca	0,46	6,84	3,8989	0,03988
ENSMUSG00000001847	Rac1	3,41	48,41	3,8296	0,00093
ENSMUSG00000049775	Tmsb4x	53,52	752,51	3,8137	0,00001
ENSMUSG00000031311	Nono	0,81	11,25	3,7877	0,01323
ENSMUSG00000029661	Col1a2	4,70	64,07	3,7675	0,00002
ENSMUSG00000026043	Col3a1	4,27	54,19	3,6651	0,00005
ENSMUSG00000038668	Lpar1	0,79	9,46	3,5764	0,02768
ENSMUSG00000001627	Ifrd1	4,41	51,40	3,5419	0,04736
ENSMUSG00000028988	Ctnnbip1	0,78	8,82	3,5013	0,02560
ENSMUSG00000027750	Postn	1,32	14,93	3,4978	0,00856
ENSMUSG00000074457	S100a16	2,54	27,96	3,4622	0,02464
ENSMUSG00000057897	Camk2b	0,76	8,24	3,4452	0,04549
ENSMUSG00000058709	Egln2	0,75	7,77	3,3666	0,04797
ENSMUSG00000001025	S100a6	5,24	49,37	3,2365	0,02306
ENSMUSG00000027712	Anxa5	3,54	33,12	3,2245	0,00923
ENSMUSG00000019929	Dcn	1,22	11,16	3,1890	0,04119
ENSMUSG00000020176	Grb10	2,02	17,88	3,1431	0,00690
ENSMUSG00000023886	Smoc2	1,32	11,27	3,0990	0,04696
ENSMUSG00000018593	Sparc	17,76	137,43	2,9515	0,00043
ENSMUSG00000031502	Col4a1	0,99	7,62	2,9502	0,04201
ENSMUSG00000022982	Sod1	35,13	270,64	2,9456	0,00245
ENSMUSG00000036371	Serbp1	1,58	12,01	2,9304	0,00719

Tabela 7: Continuação

Ensemble ID	Gene	FPKM HERS	FPKM PN13	Log2 (fold change)	Valor q
ENSMUSG00000026586	Prrx1	1,23	9,28	2,9191	0,04864
ENSMUSG00000035242	Oaz1	12,28	89,84	2,8708	0,00826
ENSMUSG00000026728	Vim	11,07	76,58	2,7905	0,00372
ENSMUSG00000030057	Cnbp	6,00	41,15	2,7774	0,04341
ENSMUSG00000029767	Calu	1,43	9,71	2,7587	0,04251
ENSMUSG00000048583	Igf2	50,66	287,34	2,5038	0,00351
ENSMUSG00000036256	Igfbp7	8,69	47,88	2,4619	0,04549
ENSMUSG00000020053	Igf1	5,05	27,48	2,4444	0,04043
ENSMUSG00000001506	Col1a1	12,81	64,44	2,3308	0,00303
ENSMUSG00000026185	Igfbp5	4,27	17,38	2,0251	0,03384

Tabela 7: FPKM = fragmentos/quilobase de exon/milhões de fragmentos mapeados (média geométrica de expressão). Log<sub>2</sub> fold change = indica a diferença de expressão. Valor de q ≤ 0,05 = genes diferencialmente expressos.



Tabela 8: 57 genes diferencialmente mais expressos na comparação PN13 x PN45 (PN13\*)

Ensembl ID	Gene	FPKM PN13	FPKM PN45	Log2 (fold change)	Valor q
ENSMUSG00000020241	Col6a2	8,22	0,08	-6,7638	0,0239
ENSMUSG00000004098	Col5a3	4,44	0,05	-6,5297	0,0298
ENSMUSG000000036256	Igfbp7	47,88	0,60	-6,3165	0,0157
ENSMUSG000000027447	Cst3	58,74	0,82	-6,1602	0,0040
ENSMUSG000000005161	Prdx2	51,62	0,74	-6,1228	0,0420
ENSMUSG000000021493	Pdlim7	5,84	0,08	-6,1198	0,0499
ENSMUSG000000023951	Vegfa	30,09	0,44	-6,0945	0,0002
ENSMUSG000000031835	Mbtps1	4,49	0,07	-6,0441	0,0437
ENSMUSG000000038239	Hrc	17,14	0,28	-5,9367	0,0223
ENSMUSG000000038485	Socs7	4,65	0,08	-5,7977	0,0074
ENSMUSG000000029152	Ociad1	33,26	0,68	-5,6060	0,0052
ENSMUSG000000020612	Prkar1a	83,80	1,79	-5,5470	0,0000
ENSMUSG000000026185	Igfbp5	17,38	0,39	-5,4696	0,0000
ENSMUSG000000031502	Col4a1	7,62	0,18	-5,4228	0,0038
ENSMUSG000000048583	Igf2	287,34	6,79	-5,4039	0,0000
ENSMUSG000000061353	Cxcl12	8,47	0,20	-5,3945	0,0305
ENSMUSG000000020048	Hsp90b1	15,53	0,37	-5,3741	0,0018
ENSMUSG000000073889	Il11ra1	226,78	5,56	-5,3506	0,0004
ENSMUSG000000028452	Vcp	6,85	0,18	-5,2366	0,0181
ENSMUSG000000028333	Anp32b	23,73	0,83	-4,8355	0,0326
ENSMUSG000000026921	Egfl7	262,48	9,83	-4,7386	0,0007
ENSMUSG000000028339	Col15a1	31,06	1,25	-4,6379	0,0436
ENSMUSG000000035342	Lzts2	5,27	0,22	-4,6150	0,0380
ENSMUSG000000030218	Mgp	30,90	1,32	-4,5544	0,0229
ENSMUSG000000036371	Serbp1	12,01	0,53	-4,5100	0,0004
ENSMUSG000000026176	Ctdsp1	6,97	0,32	-4,4589	0,0323
ENSMUSG000000025856	Pdgfa	30,23	1,51	-4,3237	0,0029
ENSMUSG00000001119	Col6a1	10,34	0,53	-4,2973	0,0063

Tabela 8: Continuação

Ensembl ID	Gene	FPKM PN13	FPKM PN45	Log2 (fold change)	Valor q
ENSMUSG00000020994	Pnn	5,06	0,26	-4,2840	0,0185
ENSMUSG00000023886	Smoc2	11,27	0,58	-4,2832	0,0222
ENSMUSG00000029718	Pcolce	42,50	2,19	-4,2794	0,0426
ENSMUSG00000036446	Lum	14,40	0,75	-4,2647	0,0076
ENSMUSG00000025162	Csnk1d	9,74	0,52	-4,2412	0,0164
ENSMUSG00000037058	Paip2	19,74	1,09	-4,1768	0,0273
ENSMUSG00000008136	Fhl2	7,32	0,41	-4,1618	0,0393
ENSMUSG00000038569	Rad9b	11,70	0,65	-4,1592	0,0473
ENSMUSG00000021823	Vcl	4,78	0,28	-4,1032	0,0341
ENSMUSG00000074457	S100a16	27,96	1,79	-3,9662	0,0166
ENSMUSG00000031447	Lamp1	11,28	0,74	-3,9358	0,0231
ENSMUSG00000020176	Grb10	17,88	1,28	-3,8068	0,0015
ENSMUSG00000042406	Atf4	55,65	4,04	-3,7855	0,0017
ENSMUSG00000035242	Oaz1	89,84	6,59	-3,7686	0,0013
ENSMUSG00000030763	Lcmt1	12,08	0,95	-3,6685	0,0440
ENSMUSG00000006699	Cdc42	29,88	2,36	-3,6614	0,0072
ENSMUSG00000025809	Itgb1	4,88	0,39	-3,6372	0,0362
ENSMUSG00000030057	Cnbp	41,15	3,34	-3,6250	0,0121
ENSMUSG00000038366	Lasp1	11,35	1,04	-3,4517	0,0322
ENSMUSG00000053931	Cnn3	25,23	2,33	-3,4336	0,0079
ENSMUSG00000019929	Dcn	11,16	1,08	-3,3735	0,0417
ENSMUSG00000021127	Zfp36l1	6,12	0,61	-3,3296	0,0443
ENSMUSG00000001847	Rac1	48,41	5,06	-3,2589	0,0027
ENSMUSG00000031954	Cfdp1	22,55	2,99	-2,9133	0,0397
ENSMUSG00000022982	Sod1	270,64	39,69	-2,7697	0,0037
ENSMUSG00000004897	Hdgf	34,48	6,19	-2,4778	0,0201
ENSMUSG00000029661	Col1a2	64,07	13,35	-2,2628	0,0043
ENSMUSG00000026043	Col3a1	54,19	11,80	-2,1987	0,0073
ENSMUSG00000049775	Tmsb4x	752,51	168,10	-2,1624	0,0105

Tabela 8: FPKM = fragmentos/quilobase de exon/milhões de fragmentos mapeados (média geométrica de expressão). Log<sub>2</sub> fold change = indica a diferença de expressão. Valor de q ≤ 0,05 = genes diferencialmente expressos.

Tabela 9: 4 genes diferencialmente mais expressos na comparação PN13 x PN45 (PN45\*)

Ensemble ID	Gene	FPKM PN13	FPKM PN45	Log2 (fold change)	Valor q
ENSMUSG00000087580	Gm16869	27,48	326,49	3,5708	0,01680
ENSMUSG00000075015	Gm10801	188,80	1932,13	3,3553	0,00001
ENSMUSG00000074561	Gm10717	39,25	376,74	3,2629	0,03942
ENSMUSG00000075014	Gm10800	2140,33	15233,30	2,8313	0,02014

Tabela 9: FPKM = fragmentos/quilobase de exon/milhões de fragmentos mapeados (média geométrica de expressão). Log<sub>2</sub> fold change = indica a diferença de expressão. Valor de q ≤ 0,05 = genes diferencialmente expressos.

## 6 DISCUSSÃO

De acordo com nossos conhecimentos, não há nenhum estudo analisando a expressão gênica tanto do ligamento periodontal quanto da bainha epitelial de Hertwig durante a formação radicular. Muitos estudos mostram o padrão de expressão gênica de genes pré-selecionados e a maioria dos estudos avalia a expressão gênica nos períodos iniciais de formação radicular, quando há pouca mineralização dos tecidos (Osmundsen *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012). Nesse estudo, apresentamos a expressão gênica em períodos bastante característicos para o desenvolvimento radicular (PN13 e PN45) de maneira a representar o início do processo de formação do ligamento periodontal e o seu período de maturação. No entanto, esse trabalho pretende apenas descrever de maneira exploratória o perfil de expressão usando a técnica de RNA-Seq. Para tanto, a técnica de captura e microdissecção a *laser* foi utilizada sobre a HERS e sobre o ligamento periodontal em períodos em que a descalcificação se faz necessária. Foi demonstrado por Salmon *et al.* (2012) que a microdissecção de tecidos descalcificados é possível mesmo havendo um maior impacto na qualidade e quantidade de RNA capturado. Nesse estudo (Salmon *et al.*, 2012) também foi demonstrado que o RIN das amostras fixadas com Protocol e descalcificadas eram de aproximadamente 2.4 e que mesmo assim a análise da expressão gênica através de qPCR foi possível. Portanto, para o nosso estudo usamos o mesmo protocolo estabelecido por Salmon *et al.* (2012) o que possibilitou um RIN também de 2.4 em média demonstrando a fragmentação das nossas amostras. No entanto, a análise de RNA-Seq foi viável levando em consideração que para essa técnica há uma etapa de fragmentação do RNA. Contraditoriamente, Sun *et al.* (2012) demonstrou uma maior qualidade de RNA para amostras congeladas e não descalcificadas para períodos PN7 e PN14, cujo RIN foi de 6,6 em média. No entanto, deve-se levar em consideração que em nosso estudo foi incluído o período PN45 que por apresentar maior mineralização dos tecidos não permitiria cortes histológicos congelados. E para que houvesse a padronização do protocolo para todas as amostras optou-se pela descalcificação.

Analisando-se os dados gerados com o RNA-Seq foi observado que a quantidade de “reads” (5-8 milhões de “reads”/amostra) gerada foi baixa em relação a outros estudos com a mesma técnica de sequenciamento (Jager *et al.*, 2011; Davanian *et al.*, 2012; Hutchins *et al.*, 2012), no entanto deve-se considerar as diferentes amostras avaliadas nos estudos. Além disso, a qualidade dos “reads” utilizados para o mapeamento foi  $\geq 30$  na escala “phred”, o que evidencia que os resultados dos genes identificados com o mapeamento estavam com boa qualidade e são confiáveis. No entanto, a falta de replicatas das amostras do nosso estudo pode ter resultado em erros nas diferenças de expressão devido à variação biológica inerente de cada animal (Fang *et al.*, 2012), pois é recomendado que experimentos que envolvam a técnica de RNA-Seq incluam pelo menos três replicatas biológicas (Auer & Doerge, 2010; Oshlack *et al.*, 2010). Deve-se salientar também que esses dados ainda serão confirmados através de qPCR e reações de imunohistoquímica/imunofluorescência com a utilização de 3 replicatas para a confirmação dos nossos achados.

A análise estatística intergrupo revelou alguns dados bem interessantes em relação à diferença de expressão gênica entre os períodos no início da formação radicular e na sua maturação. Observou-se que dos genes diferencialmente expressos, a maioria se concentra no período PN13, tanto na comparação PN13HERS vs. PN13 quanto na comparação PN13 vs. PN45. Observa-se que apesar dos genes estarem presentes nos dois períodos, poucos genes são estatisticamente significantes para HERS e para PN45, evidenciando que tanto as diferenças de expressão nos períodos iniciais, quando se compara as células da bainha epitelial de Hertwig com o ligamento periodontal (PN13 HERS vs. PN13), quanto as diferenças de expressão na comparação do período inicial de formação do ligamento periodontal com o ligamento periodontal já formado e maduro (PN13 vs. PN45), são bem pontuais.

A análise de enriquecimento das categorias de genes diferencialmente expressos nos forneceu dados que podem estar superestimando a significância pelo fato de não haver réplicas. Por esta razão, foi aplicado um limite no valor de  $p \leq 0,05$ , correção

de Benjamini-Hochberg e um fold change  $\geq 2$ . Com esse cuidado, um grande número de genes diferencialmente expressos está representado nas categorias biológicas e podem ser de grande relevância para o desenvolvimento dental nos diferentes períodos comparados. Também foi possível se perceber que a análise KEGG de sinalização biológica mostrou uma mudança de perfil das vias de sinalização para os diferentes períodos comparados.

Analisando os genes diferencialmente expressos para PN13HERS na comparação PN13 HERS vs. PN13, 13 deles foram escolhidos de acordo com as suas funções. No entanto, quando os estudos científicos que pudessem nos fornecer importantes informações quanto ao metabolismo molecular das células de HERS para a formação radicular e do periodonto foram avaliados, apenas 2 deles apresentavam funções relacionadas com o desenvolvimento. Já foi demonstrado que o gene *Lingo2* está relacionado com o desenvolvimento embrionário de camundongos (Haines & Rigby, 2008) e podemos sugerir que esse gene está relacionado com o desenvolvimento radicular e formação do periodonto por estar presente em HERS, cujas células são mesenquimais não diferenciadas provenientes do folículo dental (Diekwisck *et al.*, 2001). Outro gene, *Itga8* faz parte da família de receptores extracelulares de matriz e são conhecidos na regulação da adesão, migração e proliferação celular. Foi demonstrado por Bieritz *et al.* (2003) que *Itga8* pode ter um papel importante na manutenção da integridade dos tecidos glomerulares e portanto, podemos inferir que a sua participação no desenvolvimento dental pode estar relacionada com a manutenção da integridade dos tecidos periodontais.

Em relação aos genes escolhidos para PN13 na comparação PN13 HERS vs. PN13, 8 deles estão envolvidos com a angiogênese, *Anxa5*, *Egln2*, *SMOC2*, *SPARC*, *Vim*, *Igf1*, *Igf2* e *Igfbp7* (Brachvogel *et al.*, 2007, Shen *et al.*, 2009, Rocnik *et al.*, 2006, Rivera *et al.*, 2011, Lund *et al.*, 2010, Piecawics *et al.*, 2012; Sheng *et al.*, 2013, Hooper *et al.*, 2009), o que demonstra que a atividade de vascularização está presente nos períodos iniciais de formação do periodonto, como era esperado, mas é importante salientar que existem muitos genes relacionados com a angiogênese e esses genes escolhidos, apesar de ainda

precisarem ser validados para esse desenho experimental, aparentemente parecem ter um importante papel no processo de angiogênese para a formação radicular.

A maioria dos genes diferencialmente expressos nesse período está relacionada com o metabolismo ósseo e demonstram importantes interações com algumas vias de sinalização para a condrogênese e osteoblastogênese (Vietor *et al.*, 2005; Gennero *et al.*, 2011; Hata *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Narayanan *et al.*, 2004; Hermann *et al.*, 2009; Van den Plas & Merregaert, 2004; Tsang *et al.*, 2010, Christensen *et al.*, 2012.; Izu *et al.*, 2012, Bozec *et al.*, 2010; Carleton *et al.*, 2008; Ponticos *et al.*, 2004, Tu *et al.*, 2003; Stomnicki & Lesniak, 2010, Mochida *et al.*, 2009; Gutierrez *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2010; Hardouin *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2005, Delany *et al.*, 2003, Mukherjee & Rotwein, 2008; Boboba & Engist, 2008). São os genes *Ifrd1*, *Lpar1*, *Nono*, *Prkaca*, *Nfe2l1*, *Egln1*, *Lasp1*, *Prkar1a*, *Postn*, *Fhl2*, *Itm2a*, *Col6a1*, *Col1a2*, *S100A6*, *Mstn*, *Igf2*, *SPARC*, *IGFBP-5*. Esses dados são bastante interessantes e demonstram a multifuncionalidade das células do ligamento periodontal na formação de diferentes células relacionadas com o periodonto como osteoblastos e cementoblastos.

Também foi possível observar a presença de 5 genes que estão envolvidos com a formação dental, *Prrx1*, *Postn*, *Fhl2*, *Nfe2l1* e *Igf1*. O gene *Postn*, periostin, atua no remodelamento da matriz de colágeno na zona de cisalhamento dos incisivos centrais, cuja erupção é contínua nos roedores permitindo dessa forma também o remodelamento do ligamento periodontal (Kii *et al.*, 2006). Essa função caracteriza o gene periostin como sendo muito importante para a erupção dental não somente nos incisivos como também nos molares de camundongos nos períodos em que a erupção está ativa. Rios *et al.* (2005) e Zhang *et al.* (2010) demonstraram que esse gene está relacionado com a manutenção da integridade do ligamento periodontal em resposta ao estresse mecânico, ou seja, no período PN13, em que a erupção está começando a acontecer, mesmo sem contato com o antagonista, esse gene já começa a ser expresso. Também tem sido mostrado que o gene *FHL2* está presente desde a fase de botão até o dia pós-natal 13,5 (Wang *et al.*, 2012). Os autores do estudo sugerem que esse gene pode ter um papel na diferenciação de

ameloblastos e odontoblastos, na secreção da matriz de esmalte e dentina, na mineralização do esmalte, na morfogênese da coroa dos molares como também na formação radicular. O outro gene relacionado com a morfogênese dental, Nfe2l1, também chamado de NRF1, está indiretamente relacionado com a atividade de DSPP, um marcador de odontoblastos diferenciados, pois interage com C/EBP- $\beta$  reprimindo a atividade do promotor de DSPP em odontoblastos não diferenciados (Narayanan *et al.*, 2004). Sendo assim, pode-se supor que o gene NRF1 está indiretamente relacionado com a diferenciação dos odontoblastos durante a formação radicular. Götz *et al.*, 2006 demonstrou com dados imunohistoquímicos de dentes permanentes humanos que a marcação com o anticorpo Igf1 está presente no cimento indicando um papel para a homeostasia e adesão das células desse tecido. Os autores também sugerem que devido à marcação imunohistoquímica no ligamento periodontal, essa estrutura pode funcionar como reservatório de Igf(s) e provavelmente estão ligados aos componentes da matriz extracelular. Seria interessante, no entanto, estudos mais aprofundados desses genes em questão para se definir espacial e temporalmente a sua expressão.

Tem sido demonstrado que a sinalização de Wnt parece ser muito importante em vários estágios de desenvolvimento do dente, mas a maioria dos estudos demonstra a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina no desenvolvimento da coroa do dente (Lohi *et al.*, 2010). Ctnnbip1 e Ifrd1 são genes que também foram identificados no período PN13 e estão relacionados com a regulação negativa da via canônica de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (Sekiya *et al.*, 2002; Vietor *et al.*, 2005). Dessa forma, há uma pequena evidência da inibição dessa via de sinalização nos períodos iniciais de formação radicular o que contradiz com as evidências de Rooker *et al.* (2010) que demonstra a participação dessa via de sinalização nas células do ligamento periodontal em proliferação.

Outro gene, bastante dinâmico em suas ações, Rac1, pertence à superfamília de proteínas ligantes - Ras e apresenta-se com diversas funções como contrações do citoesqueleto, crescimento celular, adesão, migração e diferenciação. Também tem sido demonstrado que Rac1 controla a função dos osteoblastos (Jung *et al.*, 2011) e dos



osteoclastos (Wang *et al.*, 2009) além de participar do desenvolvimento vascular (Tan *et al.*, 2008). Todas essas funções estão presentes durante o desenvolvimento do dente e da raiz, e mais especificamente foi demonstrado no estudo de Huang *et al.*, 2011 que camundongos knockout para Rac1 apresentaram severos defeitos estruturais com a completa perda do esmalte após a erupção dos dentes. Apesar de sua multifuncionalidade, esses resultados demonstram um papel importante dessa proteína no epitélio dental envolvendo as interações da matriz celular e da biomineralização da matriz.

O gene *Mstn* é um fator de crescimento e diferenciação que pertence à família de TGF- $\beta$ . Decorin é um supressor dessa família e tem sido demonstrado que níveis normais de expressão desse supressor podem propor um papel importante no processo de mineralização de dentina (Haruyama *et al.*, 2009). Dessa forma, sugere-se que o gene *Mstn* pode estar em equilíbrio com o seu supressor durante o processo de formação e mineralização da dentina no período PN13, o que demonstra a sua função para o processo de formação radicular. Também foi identificado, nesse estudo, o gene *Col1a1* que foi demonstrado com envolvimento no reparo e regeneração dentinária após evidências de altos níveis de expressão, em camundongos transgênicos com GFP, de células odontoblásticas que repararam dentina (Braut *et al.*, 2003). Esse estudo também pode fornecer evidências sobre a função desse gene sobre a formação radicular nos animais do nosso estudo.

O gene SPARC, também chamado de osteonectina tem sido demonstrado com funções relacionadas ao osso alveolar e ligamento periodontal. Trombetta & Bradshaw (2010) demonstraram que esse gene é crítico no controle do tecido colágeno e indica a sua necessidade para o controle da homeostasia do ligamento periodontal. Outro estudo também demonstrou que em animais “*Knockout*” para esse gene há diminuição das fibras colágenas (Trombetta *et al.*, 2011). Além disso, foi também demonstrado que a sua função como regulador da migração celular tem um papel importante para a formação do

tecido de granulação e a cicatrização (Basu *et al.*, 2001). Todos esses dados podem demonstrar a importância do gene SPARC para a formação radicular no nosso estudo.

Para o período PN13 na comparação PN13 vs. PN45 o padrão de expressão muda sutilmente em relação aos genes ativados em PN13 na comparação PN13 HERS vs. PN13, mas não em relação às funções especificamente. Dessa forma, 12 genes (Zfp3611, Itgb1, Atf4, Pdgfa, Ctdsp1, Vcp, Cst3, Mbtps1, Col5a3, Col6a1, Igfbp5 e POLCE1) estão envolvidos com a proliferação e diferenciação dos osteoblastos no desenvolvimento e remodelamento ósseo (Reppe *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2007; Kobaku *et al.*, 2011; Behnam *et al.*, 2005; Danjo *et al.*, 2007; Patra *et al.*, 2011, Yun-Feng *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2005, Christensen *et al.*, 2012.; Izu *et al.*, 2012, Abdallah, 2006, Steiglitiz *et al.*, 2006 ) o que mostra que essa função está inteiramente ligada com as células do ligamento periodontal em desenvolvimento, visto que também se apresenta em grande número em PN13 na comparação PN13 HERS vs. PN13. O gene Itgb1 é uma fibronectina e está envolvido com outras funções além da citada acima, participando da transmissão de sinais por ser uma proteína transmembrana. Watanabe *et al.* (2011) demonstraram essa transmissão de sinais nos osteoblastos mandibulares na ativação da via PI3K/Akt. Além disso, foi mostrado que o gene Oaz1 regula BMP4 através da sinalização de Smad6 (Ku *et al.*, 2006). Como também já foi demonstrado que a sinalização de BMP4 funciona como agente regulador para a formação de HERS durante o desenvolvimento radicular (Hosoya *et al.*, 2008), provavelmente esses dois genes agem em conjunto para a formação radicular e do periodonto.

Quatro genes estão relacionados com a modulação da migração dos fibroblastos, outra função que parece ser muito importante nessa fase de desenvolvimento radicular e que provavelmente participa da remodelação das fibras do ligamento periodontal. Appel *et al.* (2010) mostrou que o gene Cnn3 controla a migração dos fibroblastos e Sipes *et al.* (2011) demonstrou que o gene Cdc42 é essencial no remodelamento da matriz extra-celular, o que confere um papel bastante importante para esse gene durante todo o processo de formação radicular. PCOLCE1 é um gene que

determina a morfologia das fibras colágenas (Steiglitz *et al.*, 2006). Vin também participa da diferenciação dos condrócitos (Koshimizu *et al.*, 2012). Dessa maneira, podemos sugerir que esses genes podem interferir com a morfogênese das fibras colágenas do ligamento periodontal em formação.

Como já foi discutido anteriormente, era de se esperar que genes que participam da angiogênese estivessem presentes nesse período de desenvolvimento (PN13) e é bastante interessante saber quais são os genes mais expressos e que efetivamente participam desse processo nessa fase de formação radicular. O gene Paip2 parece ser crucial como regulador do RNA mensageiro de VEGF e como consequência, qualquer variação na sua expressão pode modular a angiogênese (Onesto *et al.*, 2004). O gene Smoc2 tem sido demonstrado como novo fator angiogênico que potencializa os efeitos angiogênicos dos fatores de crescimento (Rocnik *et al.*, 2006). Igfbp7 ou angiomodulina é um marcador específico de vascularização e regula a angiogênese através da modulação de VEGFa (Hooper *et al.*, 2009). Já o gene Lum ou Lumican também tem sido identificado como novo regulador da angiogênese (Albig *et al.*, 2007). No entanto, a proteína codificada por esse gene é caracterizada como molécula de adesão e tem sido encontrada no cimento (Grzesik *et al.*, 2000) podendo também ser encontrada nas células diferenciadas da HERS em estudos *in vitro* (Zeichner-David *et al.*, 2003). Como no atual estudo a sua expressão está sendo demonstrada em PN13, provavelmente esse gene Lum pode ser importante para a angiogênese e a diferenciação das células do ligamento periodontal, ou de certa forma, receber uma influência das células da HERS nas células diferenciadas do ligamento periodontal. Vegfa é um marcador de angiogênese que até pouco tempo era desconhecido no tecido gengival, mas que se mostrou presente no estudo de Nogushi *et al.* (2011). Sendo assim, podemos sugerir a sua provável presença no tecido periodontal em formação. Col4a1 também foi um gene identificado nesse período PN13 avaliado e tem sido demonstrado com envolvimento na manutenção do tônus vascular e função das células endoteliais (Van Agtmael *et al.*, 2010). Como demonstrado, todos esses genes relacionados com a angiogênese estão presentes nessa fase de

desenvolvimento radicular e do periodonto sugerindo, conseqüentemente, definidos papéis.

Seis genes (*Lcmt1*, *Grb10*, *Pnn*, *Anp32b*, *Rad9b*, *Igf2*) estão diretamente ligados com o desenvolvimento normal dos camundongos e por estarem presentes nessa fase de desenvolvimento radicular podem também ser importantes para a formação radicular e periodontal (Leu & Ouyang, 2006; Lee & Pallas, 2007; Liu *et al.*, 2009; Filkielstain *et al.*, 2009; Leloup *et al.*, 2010; Reilly *et al.*, 2011). Foi demonstrado que o gene *Lzts2* participa do processo de desenvolvimento, mas atualmente só existe um trabalho identificando a sua função como participante da nefrogênese (Peng *et al.*, 2011). No entanto, podemos supor que esse gene também é importante para o desenvolvimento radicular e periodontal, mesmo sendo identificado pela primeira vez nesse tecido.

O gene *Ociad1* foi identificado como marcador de células-tronco por estar presente nas células-tronco embrionárias nos camundongos em desenvolvimento (Mukhopadhyay *et al.*, 2003). E o gene *Hsp90b1* tem sido reconhecido na função de manutenção da interação das células-tronco hematopoiéticas com seus nichos e, portanto regulando a fisiologia da célula (Luo *et al.*, 2011). Dessa forma, esses dois estudos podem sugerir possíveis marcadores de células-tronco durante o desenvolvimento radicular e do periodonto, o que é um dado muito importante, pois as células-tronco podem ser usadas para a regeneração dos tecidos (Wagers & Weissman, 2004; Moore & Lemischka, 2006).

Também foram identificados genes relacionados com a formação dental. O gene *Csnk1d* foi imunohistoquimicamente identificado durante a odontogênese em ratos (Smith *et al.*, 1990), e pela primeira vez identificado através da sua expressão gênica podendo ter um papel importante na odontogênese de camundongos. Outros genes, como *Tmsb4x*, *Cnbp*, *Mgp* e *Pdlim7* também foram demonstrados em processos de desenvolvimento dental. Foi mostrado que o gene *Cnbp* foi expresso durante o desenvolvimento de molares no período embrionário de até 18 dias em camundongos (Uchibe *et al.*, 2012). Além disso, o gene *Tmsb4x* pode estar envolvido com a proliferação

celular do epitélio oral nos estágios iniciais de desenvolvimento dos dentes, pois regula a expressão e secreção de proteínas relacionadas com a mineralização durante a diferenciação dos odontoblastos (Choi *et al.*, 2012). O gene *Pdlim7* foi identificado imunohistoquimicamente em odontoblastos e ameloblastos em diferentes fases de desenvolvimento do molar em camundongos. No entanto, no período de 13,5 dias pós-natal, os anticorpos de marcação não foram mais detectados (Fang *et al.*, 2010). Dessa forma, podemos sugerir que esse gene faz parte do desenvolvimento dos molares e, apesar de ter sido expresso geneticamente em nosso estudo, ainda é preciso validar nossos resultados com qPCR e imunohistoquímica. O gene *Mgp* tem sido demonstrado como inibidor de mineralização segundo Kaipatur *et al.* (2008) em esmalte, dentina, osso e cimento. Portanto, podemos inferir que a expressão desse gene em PN13 pode funcionar como inibidor de mineralização num primeiro momento de formação dessas estruturas, o que pode permitir que haja a contínua formação radicular através da proliferação das células do periodonto para depois haver a diferenciação.

Para o período PN45 na comparação PN13 vs. PN45, quatro genes foram escolhidos como candidatos, *Gm16869*, *Gm10801*, *Gm10717* e *Gm10800*. No entanto, esses genes ainda não são conhecidos e nunca foram identificados em nenhum outro tecido estudado até o momento. Cabe aos pesquisadores, portanto, mais estudos com esses genes recém-identificados para um melhor entendimento sobre as suas funções na formação radicular e periodontal.

Podemos ainda, após a análise dos genes escolhidos, inferir que alguns genes que estão relacionados com determinada função na literatura científica pode participar de diferentes funções em estudos com outros desenhos experimentais o que pode ser bem interessante frente a grande quantidade de dados obtidos com a técnica de RNA-Seq. Sendo este um dos intuitos da técnica, genes já conhecidos em outros tecidos podem estar participando do desenvolvimento radicular bem como genes nunca antes identificados.

Vale salientar que todas essas inferências realizadas são apenas suposições em relação às funções dos genes escolhidos como candidatos e que mesmo baseados na literatura científica suas validações serão realizadas através de qPCR e imunohistoquímica/fluorescência.

## **7 CONCLUSÃO**

1. Nosso estudo fornece o primeiro passo para um melhor entendimento e compreensão do transcriptoma de ligamento periodontal e bainha epitelial de Hertwig em períodos-chave para a formação radicular.
2. Dentro dos limites do presente estudo, podemos concluir que a análise dos dados gerados com o RNA-Seq mostrou uma grande diferença no padrão de expressão gênica entre os períodos estudados (PN13 vs. PN45) e estruturas estudadas (PN13 HERS vs. PN13), além de revelar novos genes associados com a formação radicular em molares de camundongos.

## REFERÊNCIAS \*

- 1) Bartold, PM, Mcculloch, CAG, Narayanan S, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology* 2000. 2000; 24: 253-69.
- 2) Thesleff, I., Vaahtokari, A., Kettunen, P., Aberg, T. Epithelial–mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res.* 1995; 32: 9-15.
- 3) Pispá, J., Thesleff, I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol.* 2003; 262: 195–205.
- 4) Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I. Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol.* 1994; 38: 436-69.
- 5) Cox CF, White KC, Ramus DL, Farmer JB, Snuggs HM. Reparative dentin: factors affecting its deposition. *Quintessence Int.* 1992; 23: 257-70.
- 6) Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol.* 1993; Med 4: 679-728.
- 7) Meikle MC. Craniofacial development, growth and evolution. Bressingham, Norfolk, England: Bateson Publishing 2000.
- 8) Kim JW, Simmer JP. Hereditary dentin defects. *J Dent Res.* 2007; 86: 392-99.
- 9) Bei M. Molecular genetics of ameloblast cell lineage. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2008; 310B: 437-44.
- 10) Cáton J, Tucker AS. Current knowledge of tooth development: patterning and mineralization of the murine dentition. *J Anat.* 2009; 214: 502-15.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.



- 11) Thomas HF, Kollar EJ. Tissue interactions in normal murine root development. In: Davidovich Z, ed. *The Biological Mechanisms of Tooth Eruption and Root Resorption*. Birmingham, AL: EBSCO Media, 1988: 145-51.
- 12) Thomas HF, Kollar EJ. Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme. *Arch Oral Biol* 1989; 34: 27-35.
- 13) Nielsen IM, Ellegaard B, Karring T. Kielbone in healing interradicular lesions in monkeys. *Journal of Periodontal Research*. 1980; 15: 328-37.
- 14) Dangaria SJ, Ito Y, Walker C, Druzinsky R, Luan X, Diekwisch TG. Extracellular matrix-mediated differentiation of periodontal progenitor cells. *Differentiation* 2009; 79: 79-90.
- 15) Huang X, Xu X, Bringas P, Hung YP, Chay Y. Smad4-Shh-Nfic signaling cascade-mediated epithelial-mesenchymal interaction is crucial in regulating tooth root development. *J Bone Miner Res* 2010; 25(5): 1167-78.
- 16) Tummers M, Thesleff I. The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009; 312B(4): 309-19.
- 17) Streelman JT, Webb JF, Albertson RC, Kocher TD. The cusp of evolution and development: a model of cichlid tooth shape diversity. *Evol Dev* 2003; 5: 600-8.
- 18) Thesleff, I., Vaahtokari, A., Kettunen, P., Aberg, T. Epithelial–mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res*. 1995; 32: 9-15.
- 19) Pispa, J., Thesleff, I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol*. 2003; 262: 195–205.
- 20) Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I. Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol*. 1994; 38: 436-69.
- 21) Owens PDA. Ultrastructure of Hertwig's epithelial root sheath during early root development in premolar teeth in dogs. *Arch Oral Biol*. 1978; 23: 91-104.

- 22) Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol.* 2001; 45: 695-706.
- 23) Hosoya A, Kim JY, Cho SW, Jung HS. BMP4 signaling regulates formation of Hertwig's epithelial root sheath during tooth root development. *Cell Tissue Res.* 2008; 333: 503-9.
- 24) Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews.* 2009; 10: 57-63.
- 25) Van Vliet AHM. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS Microbiology Letters.* 2010; 302: 1-7.
- 26) Bradford JR, Hey Y, Yates T, Li Y, Pepper SD, Miller CJ: A comparison of massively parallel nucleotide sequencing with oligonucleotide microarrays for global transcription profiling. *BMC Genomics* 2010, 11: 282.
- 27) Wang X, Sun Q, Soloway PD, Clark AG. Transcriptome-wide identification of novel imprinted genes in neonatal mouse brain. *PloS One.* 2008; 3: e3839.
- 28) Marguerat S, Bahler J. RNA-Seq: from technology to biology. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67: 569-79.
- 29) Chen G, Wang C, Shi TL. Overview of available methods for diverse RNA-Seq data analyses. *Sci China Life Sci.* 2011; 54: 1121-8.
- 30) Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews in Genetics.* 2010; 11: 31-46.
- 31) Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology.* 2008; 26: 1135-45.
- 32) Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995; 270(5235): 467-70.
- 33) Lashkari DA, McCusker JH, Davis RW. Whole genome analysis: experimental access to all genome sequenced segments through larger-scale efficient oligonucleotide synthesis and PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(17): 8945-7.

- 34) Malone JH, Oliver B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biol.* 2011; 9: 34-42.
- 35) Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-Seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.* 2008; 18(9): 1509-17.
- 36) Nookaew I, Papini M, Pornputtpong N, Scalcinati G, Fagerberg L, Uhle'n M *et al.* A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research.* 2012; 40(20): 1–14.
- 37) Wilhelm BT, Landry, JR. RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods.* 2009; 48: 249–57.
- 38) Salmon CR, Silvério KG, Giorgetti APO, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH. Gene Expression Analysis in Microdissected Samples from decalcified tissues. *Diagn Mol Pathol.* 2012; 21: 120–6.
- 39) Smith S, Wilson NG, Goetz F, Feehery C, Andrade SCS, Rouse GW, *et al.* Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. *Nature.* 2011; 480: 364-7.
- 40) Trapnell C, Pachter L, Salzberg S. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics.* 2009; 25: 1105–11.
- 41) Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg S. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 2009; 10: R25.
- 42) Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, *et al.* The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009; 25: 2078-9.
- 43) Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol.* 2010; 28: 511-5.

- 44) Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society.* 1995; 57: 289–300.
- 45) Duncan DT, Prodduturi N, Zhang B. WebGestalt2: an updated and expanded version of the Web-based Gene Set Analysis Toolkit. *BMC Bioinformatics.* 2010; 11 (Suppl 4): P10.
- 46) Zhang B, Kirov SA, Snoddy JR. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: W741-8.
- 47) Osmundsen H, Landin MA, From SH, Kolltveit KM, Risnes S. Changes in gene-expression during development of the murine molar tooth germ. *Arch Oral Biol.* 2007; 52: 803–813.
- 48) Kim KM, Lim J, Choi YA, Kim JY, Shin HI, Park EK. Gene expression profiling of oral epithelium during tooth development. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(8): 1100-7.
- 49) Sun JX, Horst OV, Bumgarner R, Lakely B, Somerman MJ, Zhang H. Laser Capture Microdissection enables cellular and molecular studies of tooth root development. *International Journal of Oral Science.* 2012; 4: 7-13.
- 50) Jager M, Ott CE, Grunhagen J, Hecht J, Schell H, Mundlos S, *et al.* Composite transcriptome assembly of RNA-Seq data in a sheep model for delayed bone healing. *BMC Genomics.* 2011; 12: 158-70.
- 51) Davanian H, Stranneheim H, Bage T, Lagervall M, Jansson L, Lundeberg J, *et al.* Gene expression profiles in paired gingival biopsies from periodontitis-affected and healthy tissues revealed by massively parallel sequencing. *Plos One.* 2012; 7(9): e46440.
- 52) Hutchins AP, Poulain S, Fujii H, Miranda-Saavedra D. Discovery and characterization of new transcripts from RNA-seq data in mouse CD4+ T cells. *Genomics.* 2012; 100(5): 303-13.
- 53) Fang Z, Martin J, Wang Z. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in RNA-Seq experiments. *Cell Biosci.* 2012; 2: 26-40.

- 54) Auer P, Doerge RW. Statistical design and analysis of RNA sequencing data. *Genetics*. 2010; 185: 405-16.
- 55) Oshlack A, Robinson MD, Young MD. From RNA-Seq reads to differential expression results. *Genome Biology*. 2010; 11: 220-30.
- 56) Haines BP, Rigby PW. Expression of the Lingo/LERN gene family during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns*. 2008; 8(2): 79-86.
- 57) Diekwisch TGH. Developmental Biology of Cementum. *Int J Dev Biol*. 2001; 45: 695-706.
- 58) Bieritz B, Spessotto P, Colombatti A, Jahn A, Prols F, Hartner A. Role of alpha8 integrin in mesangial cell adhesion, migration, and proliferation. *Kidney Int*. 2003; 64(1): 119-27.
- 59) Brachvogel B, Pausch F, Farlie P, Gaipf U, Etich J, Zhou Z, *et al*. Isolated Anxa5+/Sca-1+ perivascular cells from mouse meningeal vasculature retain their perivascular phenotype in vitro and in vivo. *Exp Cell Res*. 2007; 313(12): 2730-43.
- 60) Shen X, Wan C, Ramaswamy G, Mavalli M, Wang Y, Duvall CL *et al*. Prolyl hydroxylase inhibitors increase neoangiogenesis and callus formation following femur fracture in mice. *J Orthop Res*. 2009; 27(10): 1298-305.
- 61) Rocnik EF, Liu P, Sato K, Walsh K, Vaziri C. The novel SPARC family member SMOC-2 potentiates angiogenic growth factor activity. *J Biol Chem*. 2006; 11; 281(32): 22855-64.
- 62) Rivera LB, Bradshaw AD, Brekken RA. The regulatory function of SPARC in vascular biology. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68(19): 3165-73.
- 63) Lund N, Henrion D, Tiede P, Ziche M, Schunkert H, Ito WD. Vimentin expression influences flow dependent VASP phosphorylation and regulates cell migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 395(3): 401-6.
- 64) Piecewicz SM, Pandey A, Roy B, Xiang SH, Zetter BR, Sengupta S. Insulin-like growth factors promote vasculogenesis in embryonic stem cells. *PLoS One*. 2012; 7(2): e32191.

- 65) Sheng MH, Zhou XD, Bonewald LF, Baylink DJ, Lau KH. Disruption of the insulin-like growth factor-1 gene in osteocytes impairs developmental bone growth in mice. *Bone*. 2013; 52(1): 133-44.
- 66) Hooper AT, Shmelkov SV, Gupta S, Milde T, Bambino K, Gillen K, *et al*. Angiomodulin is a specific marker of vasculature and regulates vascular endothelial growth factor-A-dependent neoangiogenesis. *Circ Res*. 2009; 105(2): 201-8.
- 67) Vietor I, Kurzbauer R, Brosch G, Huber LA. TIS7 regulation of the beta-catenin/Tcf-4 target gene osteopontin (OPN) is histone deacetylase-dependent. *J Biol Chem*. 2005; 280(48): 39795-801.
- 68) Gennero I, Laurencin-Dalicioux S, Conte-Auriol F, Briand-Mésange F, Laurencin D, Rue J, *et al*. Absence of the lysophosphatidic acid receptor LPA1 results in abnormal bone development and decreased bone mass. *Bone*. 2011; 49(3): 395-403.
- 69) Hata K, Nishimura R, Muramatsu S, Matsuda A, Matsubara T, Amano K, *et al*. Paraspeckle protein p54nrb links Sox9-mediated transcription with RNA processing during chondrogenesis in mice. *J Clin Invest*. 2008; 118(9): 3098-108.
- 70) Wang W, Lian N, Ma Y, Li L, Gallant RC, Elefteriou F, Yang X. Chondrocytic Atf4 regulates osteoblast differentiation and function via Ihh. *Development*. 2012; 139(3): 601-11.
- 71) Narayanan K, Ramachandran A, Peterson MC, Hao J, Kolstø AB, Friedman AD, *et al*. The CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP)beta and Nrf1 interact to regulate dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene expression during odontoblast differentiation. *J Biol Chem*. 2004; 279(44): 45423-32.
- 72) Hermann-Kleiter N, Ghaffari-Tabrizi N, Blumer MJ, Schwarzer C, Mazur MA, Artner I. Lasp1 misexpression influences chondrocyte differentiation in the vertebral column. *Int J Dev Biol*. 2009; 53(7): 983-91.
- 73) Van den Plas D, Merregaert J. In vitro studies on Itm2a reveal its involvement in early stages of the chondrogenic differentiation pathway. *Biol Cell*. 2004; 96(6): 463-70.

- 74) Tsang KM, Starost MF, Nesterova M, Boikos SA, Watkins T, Almeida MQ, *et al.* Alternate protein kinase A activity identifies a unique population of stromal cells in adult bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(19): 8683-8.
- 75) Christensen SE, Coles JM, Zelenski NA, Furman BD, Leddy HA, Zauscher S *et al.* Altered trabecular bone structure and delayed cartilage degeneration in the knees of collagen VI null mice. *PLoS One.* 2012; 7(3): e33397.
- 76) Izu Y, Ezura Y, Mizoguchi F, Kawamata A, Nakamoto T, Nakashima K, *et al.* Type VI collagen deficiency induces osteopenia with distortion of osteoblastic cell morphology. *Tissue Cell.* 2012; 44(1): 1-6.
- 77) Bozec A, Bakiri L, Jimenez M, Schinke T, Amling M, Wagner EF. Fra-2/AP-1 controls bone formation by regulating osteoblast differentiation and collagen production. *J Cell Biol.* 2010; 190(6): 1093-106.
- 78) Carleton SM, McBride DJ, Carson WL, Huntington CE, Twenter KL, Rolwes KM, *et al.* Role of genetic background in determining phenotypic severity throughout postnatal development and at peak bone mass in Col1a2 deficient mice. *Bone.* 2008; 42(4): 681-94.
- 79) Ponticos M, Abraham D, Alexakis C, Lu QL, Black C, Partridge T, *et al.* Col1a2 enhancer regulates collagen activity during development and in adult tissue repair. *Matrix Biol.* 2004; 22(8): 619-28.
- 80) Tu Q, Pi M, Quarles LD. Calcyclin mediates serum response element (SRE) activation by an osteoblastic extracellular cation-sensing mechanism. *J Bone Miner Res.* 2003; 18(10): 1825-33.
- 81) Słomnicki LP, Leśniak W. S100A6 (calcyclin) deficiency induces senescence-like changes in cell cycle, morphology and functional characteristics of mouse NIH 3T3 fibroblasts. *J Cell Biochem.* 2010; 109(3): 576-84.
- 82) Mochida Y, Parisuthiman D, Pornprasertsuk-Damrongsri S, Atsawasuwana P, Sricholpech M, Boskey AL, *et al.* Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. *Matrix Biol.* 2009; 28(1): 44-52.

- 83) Gutierrez J, Osses N, Brandan E. Changes in secreted and cell associated proteoglycan synthesis during conversion of myoblasts to osteoblasts in response to bone morphogenetic protein-2: role of decorin in cell response to BMP-2. *J Cell Physiol.* 2006; 206(1): 58-67.
- 84) Chen L, Jiang W, Huang J, He BC, Zuo GW, Zhang W, *et al.* Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) potentiates BMP-9-induced osteogenic differentiation and bone formation. *J Bone Miner Res.* 2010; 25(11): 2447-59.
- 85) Hardouin SN, Guo R, Romeo PH, Nagy A, Aubin JE. Impaired mesenchymal stem cell differentiation and osteoclastogenesis in mice deficient for Igf2-P2 transcripts. *Development.* 2011; 138(2): 203-13.
- 86) Sun WL, Chen LL, Yan J, Yu ZS. Effects of IGF-II on promoting proliferation and regulating nitric oxide synthase gene expression in mouse osteoblast-like cell [abstract]. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005; 6(7): 699-704.
- 87) Delany AM, Kalajzic I, Bradshaw AD, Sage EH, Canalis E. Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology.* 2003; 144(6): 2588-96.
- 88) Mukherjee A, Rotwein P. Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits osteoblast differentiation and skeletal growth by blocking insulin-like growth factor actions. *Mol Endocrinol.* 2008; 22(5): 1238-50.
- 89) Bobola N, Engist B. IGFBP5 is a potential regulator of craniofacial skeletogenesis. *Genesis.* 2008; 46(1): 52-9.
- 90) Kii I, Amizuka N, Minqi L, Kitajima S, Saga Y, Kudo A. Periostin is an extracellular matrix protein required for eruption of incisors in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 342(3): 766-72.
- 91) Rios H, Koushik SV, Wang H, Wang J, Zhou HM, Lindsley A, *et al.* Periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(24): 11131-44.



- 92) Zhang H, Tompkins K, Garrigues J, Snead ML, Gibson CW, Somerman MJ. Full length amelogenin binds to cell surface LAMP-1 on tooth root/periodontium associated cells. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(6): 417-25.
- 93) Wang W, Lian N, Ma Y, Li L, Gallant RC, Elefteriou F, *et al.* Chondrocytic Atf4 regulates osteoblast differentiation and function via Ihh. *Development.* 2012; 139(3): 601-11.
- 94) Narayanan K, Ramachandran A, Peterson MC, Hao J, Kolstø AB, Friedman AD, *et al.* The CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) beta and Nrf1 interact to regulate dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene expression during odontoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2004; 279(44): 45423-32.
- 95) Lohi MA, Tucker AS, Sharpe PT. Expression of Axin2 indicates a role for canonical Wnt signaling in development of the crown and root during pre- and postnatal tooth development. *Dev Dyn.* 2010; 239: 160-7.
- 96) Sekiya T, Nakamura T, Kazuki Y, Oshimura M, Kohu K, Tago K, *et al.* Overexpression of Icat induces G(2) arrest and cell death in tumor cell mutants for adenomatous polyposis coli, beta-catenin, or Axin. *Cancer Res.* 2002; 62(11): 3322-6.
- 97) Vietor I, Kurzbauer R, Brosch G, Huber LA. TIS7 regulation of the beta-catenin/Tcf-4 target gene osteopontin (OPN) is histone deacetylase-dependent. *J Biol Chem.* 2005; 280(48): 39795-801.
- 98) Rooker SM, Liu B, Helms JA. Role of Wnt signaling in the biology of the periodontium. *Dev Dyn.* 2010; 239(1): 140-7.
- 99) Jung GY, Park YJ, Han JS. Mediation of Rac1 activation by kindlin-2: an essential function in osteoblast adhesion, spreading, and proliferation. *J Cell Biochem.* 2011; 112(9): 2541-8.
- 100) Wang Y, Belsham DD, Glogauer M. Rac1 and Rac2 in osteoclastogenesis: a cell immortalization model. *Calcif Tissue Int.* 2009; 85(3): 257-66.
- 101) Tan W, Palmby TR, Gavard J, Amornphimoltham P, Zheng Y, Gutkind JS. An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *FASEB J.* 2008; 22(6): 1829-38.

- 102) Haruyama N, Sreenath TL, Suzuki S, Yao X, Wang Z, Wang Y, *et al.* Genetic evidence for key roles of decorin and biglycan in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 2009; 28(3): 129-36.
- 103) Braut A, Kollar EJ, Mina M. Analysis of the odontogenic and osteogenic potentials of dental pulp in vivo using a Col1a1-2.3-GFP transgene. *Int J Dev Biol.* 2003; 47(4): 281-92.
- 104) Trombetta JM, Bradshaw AD. SPARC/osteonectin functions to maintain homeostasis of the collagenous extracellular matrix in the periodontal ligament. *J Histochem Cytochem.* 2010; 58(10): 871-9.
- 105) Trombetta-Esilva J, Yu H, Arias DN, Rossa C Jr, Kirkwood KL, Bradshaw AD. LPS induces greater bone and PDL loss in SPARC-null mice. *J Dent Res.* 2011; 90(4): 477-82.
- 106) Basu A, Kligman LH, Samulewicz SJ, Howe CC. Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40). *BMC Cell Biol.* 2001; 2: 15.
- 107) Wang W, Lian N, Ma Y, Li L, Gallant RC, Elefteriou F, Yang X. Chondrocytic Atf4 regulates osteoblast differentiation and function via Ihh. *Development.* 2012; 139(3): 601-11.
- 108) Reppe S, Olstad OK, Rian E, Gautvik VT, Gautvik KM, Jemtland R. Butyrate response factor 1 is regulated by parathyroid hormone and bone morphogenetic protein-2 in osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 324(1): 218-23.
- 109) Kim JW, Simmer JP. Hereditary dentin defects. *J Dent Res.* 2007; 86: 392-99.
- 110) Kokabu S, Ohte S, Sasanuma H, Shin M, Yoneyama K, Murata E, *et al.* Suppression of BMP-Smad signaling axis-induced osteoblastic differentiation by small C-terminal domain phosphatase 1, a Smad phosphatase. *Mol Endocrinol.* 2011; 25(3): 474-81.

- 111) Behnam K, Murray SS, Brochmann EJ. Identification and characterization of valosin-containing protein (VCP/p97) in untransformed osteoblast-like cells. *J Orthop Res.* 2005; 23(3): 618-24.
- 112) Danjo A, Yamaza T, Kido MA, Shimohira D, Tsukuba T, Kagiya T, *et al.* Cystatin C stimulates the differentiation of mouse osteoblastic cells and bone formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 360(1): 199-204.
- 113) Patra D, DeLassus E, Hayashi S, Sandell LJ. Site-1 protease is essential to growth plate maintenance and is a critical regulator of chondrocyte hypertrophic differentiation in postnatal mice. *J Biol Chem.* 2011; 19; 286(33): 29227-40.
- 114) Yun-Feng W, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yoshioka H. Sp7/Osterix up-regulates the mouse pro-alpha3 (V) collagen gene (Col5a3) during the osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 394(3): 503-8.
- 115) Yamaguchi K, Matsuo N, Sumiyoshi H, Fujimoto N, Iyama KI, Yanagisawa S, *et al.* Pro-alpha3(V) collagen chain is expressed in bone and its basic N-terminal peptide adheres to osteosarcoma cells. *Matrix Biol.* 2005; 24(4): 283-94.
- 116) Abdallah BM. Osteoblast differentiation of NIH3T3 fibroblasts is associated with changes in the IGF-I/IGFBP expression pattern. *Cell Mol Biol Lett.* 2006; 11(4): 461-74.
- 117) Steiglitz BM, Kreider JM, Frankenburg EP, Pappano WN, Hoffman GG, Meganck JA, *et al.* Procollagen C proteinase enhancer 1 genes are important determinants of the mechanical properties and geometry of bone and the ultrastructure of connective tissues. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(1): 238-49.
- 118) Watabe H, Furuhashi T, Tani-Ishii N, Mikuni-Takagaki Y. Mechanotransduction activates  $\alpha_5\beta_1$  integrin and PI3K/Akt signaling pathways in mandibular osteoblasts. *Exp Cell Res.* 2011; 317(18): 2642-9.
- 119) Ku M, Howard S, Ni W, Lagna G, Hata A. OAZ regulates bone morphogenetic protein signaling through Smad6 activation. *J Biol Chem.* 2006; 24; 281(8): 5277-87.

- 120) Appel S, Allen PG, Vetterkind S, Jin JP, Morgan KG. h3/Acidic calponin: an actin-binding protein that controls extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity in nonmuscle cells. *Mol Biol Cell*. 2010; 15; 21(8): 1409-22.
- 121) Sipes NS, Feng Y, Guo F, Lee HO, Chou FS, Cheng J, *et al*. Cdc42 regulates extracellular matrix remodeling in three dimensions. *J Biol Chem*. 2011; 21; 286(42): 36469-77.
- 122) Koshimizu T, Kawai M, Kondou H, Tachikawa K, Sakai N, Ozono K *et al*. Vinculin functions as regulator of chondrogenesis. *J Biol Chem*. 2012; 287(19): 15760-75.
- 123) Onesto C, Berra E, Grépin R, Pagès G. Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J Biol Chem*. 2004; 13; 279(33): 34217-26.
- 124) Rocnik EF, Liu P, Sato K, Walsh K, Vaziri C. The novel SPARC family member SMOC-2 potentiates angiogenic growth factor activity. *J Biol Chem*. 2006; 281(32): 22855-64.
- 125) Hooper AT, Shmelkov SV, Gupta S, Milde T, Bambino K, Gillen K, *et al*. Angiomodulin is a specific marker of vasculature and regulates vascular endothelial growth factor-A-dependent neoangiogenesis. *Circ Res*. 2009; 17; 105(2): 201-8.
- 126) Albig AR, Roy TG, Becenti DJ, Schiemann WP. Transcriptome analysis of endothelial cell gene expression induced by growth on matrigel matrices: identification and characterization of MAGP-2 and lumican as novel regulators of angiogenesis. *Angiogenesis*. 2007; 10(3): 197-216.
- 127) Grzesik WJ, Cheng H, Oh JS, Kuznetsov SA, Mankani MH, Uzawa K, *et al*. Cementum-forming cells are phenotypically distinct from bone-forming cells. *J Bone Miner Res*. 2000; 15(1): 52-9.
- 128) Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, *et al*. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn*. 2003; 228: 651-63.

- 129) Noguchi K, Miwa Y, Sunohara M, Sato I. Analysis of vascular distribution and growth factors in human gingival tissue associated with periodontal probing depth [abstract]. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2011; 88(2): 75-83.
- 130) Van Agtmael T, Bailey MA, Schlötzer-Schrehardt U, Craigie E, Jackson IJ, Brownstein DG, *et al.* Col4a1 mutation in mice causes defects in vascular function and low blood pressure associated with reduced red blood cell volume. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(6): 1119-28.
- 131) Lee S, Bowrin K, Hamad AR, Chakravarti S. Extracellular matrix lumican deposited on the surface of neutrophils promotes migration by binding to beta2 integrin. *J Biol Chem.* 2009; 284(35): 23662-9.
- 132) Liu Q, Wang Y, Chen Y, Zhang FW, Gu TT, Qu YP, *et al.* The expression analysis of Grb10 during mouse embryonic development [abstract]. *Yi Chuan.* 2009 Jul;31(7):732-40.
- 133) Leu S, Ouyang P. Spatial and temporal expression profile of pinin during mouse development. *Gene Expr Patterns.* 2006; 6(6): 620-31.
- 134) Reilly PT, Afzal S, Gorrini C, Lui K, Bukhman YV, Wakeham A, *et al.* Acidic nuclear phosphoprotein 32kDa (ANP32) B-deficient mouse reveals a hierarchy of ANP32 importance in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 21; 108(25): 10243-8.
- 135) Leloup C, Hopkins KM, Wang X, Zhu A, Wolgemuth DJ, Lieberman HB. Mouse Rad9b is essential for embryonic development and promotes resistance to DNA damage. *Dev Dyn.* 2010; 239(11): 2837-50.
- 136) Finkielstain GP, Forcinito P, Lui JC, Barnes KM, Marino R, Makaroun S, *et al.* An extensive genetic program occurring during postnatal growth in multiple tissues. *Endocrinology.* 2009; 150(4): 1791-800.
- 137) Peng Y, Clark C, Luong R, Tu WH, Lee J, Johnson DT, *et al.* The leucine zipper putative tumor suppressor 2 protein LZTS2 regulates kidney development. *J Biol Chem.* 2011; 286(46): 40331-42.

- 138) Mukhopadhyay A, Das D, Inamdar MS. Embryonic stem cell and tissue-specific expression of a novel conserved gene, *asrij*. *Dev Dyn*. 2003; 227(4): 578-86.
- 139) Luo B, Lam BS, Lee SH, Wey S, Zhou H, Wang M, *et al*. The endoplasmic reticulum chaperone protein GRP94 is required for maintaining hematopoietic stem cell interactions with the adult bone marrow niche. *PLoS One*. 2011; 6(5): e20364.
- 140) Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004; 116(5): 639-48.
- 141) Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006; 311(5769): 1880-5.
- 142) Smith AJ, Wilson C, Matthews JB. An immunocytochemical study of keratin reactivity during rat odontogenesis. *Histochemistry*. 1990; 94(3): 329-35.
- 143) Uchibe K, Shimizu H, Yokoyama S, Kuboki T, Asahara H. Identification of novel transcription-regulating genes expressed during murine molar development. *Dev Dyn*. 2012; 241(7): 1217-26.
- 144) Choi BD, Yun SH, Jeong SJ, Wang G, Kim HJ, Lim DS, *et al*. Expression of thymosin  $\beta$ 4 in odontoblasts during mouse tooth development. *Int J Mol Med*. 2012; 29(5): 841-7.
- 145) Fang P, Wang X, Zhang L, Yuan G, Chen Z, Zhang Q. Immunohistochemical localization of LIM mineralization protein 1 during mouse molar development. *J Mol Histol*. 2010; 41(4-5): 199-203.

# ANEXOS

## Anexo 1



CEUA/Unicamp

### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp


#### CERTIFICADO


Certificamos que o Protocolo nº 2101-1, sobre "Padrão de expressão da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina no ligamento periodontal durante o desenvolvimento radicular", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr. / Ana Paula Oliveira Giorgetti Bossolan, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 08 de março de 2010.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2101-1, entitled "Patterns on Wnt/ $\beta$ -catenin pathway expression in mouse periodontal ligament during tooth root development", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 8, 2010.

Campinas, 08 de março de 2010.

  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alenso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

## Gene Expression Analysis in Microdissected Samples from Decalcified Tissues

*Cristiane Ribeiro Salmon, DDS, MS, PhD,\* Karina Gonzales Silvério, DDS, MS, PhD,\* Ana Paula de Oliveira Giorgetti, DDS, MS,\* Enilson Antonio Sallum, DDS, MS, PhD,\* Márcio Zaffalon Casati, DDS, MS, PhD,\* and Francisco Humberto Nociti, Jr, DDS, MS, PhD\*†*

**Objective:** The aim of this study was to determine the impact of standard methods for processing decalcified highly mineralized tissues on RNA yield and quality from microdissected samples.

**Design:** Rat mandibles were fixed with either formalin-based or ethanol-based fixatives, decalcified in 20% ethylenediaminetetraacetic acid solution for 15 days, and embedded in paraffin. Transversal sections of the molars were mounted on membrane glass slides for laser capture microdissection. Unfixed frozen liver samples were used as controls to determine the impact of fixatives, decalcification and paraffin embedding on RNA integrity and recovery after sample preparation, and laser microdissection. Total RNA was obtained from periodontal ligament and fresh-frozen liver; RNA quality was assessed by Bioanalyzer, and 5 ng of total RNA was used for cDNA synthesis followed by gene expression analyses by polymerase chain reaction using 3 sets of primers for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

**Results:** Data analysis demonstrated that all fixed samples presented some level of RNA fragmentation as compared with fresh-frozen samples ( $P < 0.05$ ). Samples fixed with Protocol (10% formalin) showed the least RNA fragmentation as compared with other fixatives ( $P < 0.05$ ), and biologically useful RNA was extracted even from microdissected samples with a minimum RNA Integrity Number of 1.5. Moreover, RNA fragments up to 396 bp were assayable by reverse transcriptase-polymerase chain reaction, although short-targeted fragments as 74 bp were more consistently amplified.

**Conclusions:** Although variable levels of RNA fragmentation should be expected, gene expression analysis can be performed from decalcified paraffin-embedded microdissected samples, with the best results obtained for short-targeted fragments around 70 bp.

**Key Words:** periodontal ligament, laser capture microdissection, gene expression

From the \*Department of Prosthodontics and Periodontics, Division of Periodontics, School of Dentistry, Campinas State University, Piracicaba, São Paulo, Brazil; and †Department of Periodontics, University of Washington, School of Dentistry, Seattle, WA.

The authors declare no conflict of interest.

Reprints: Cristiane Ribeiro Salmon, DDS, MS, PhD, Avenida Limeira 901, Bairro Areião, Piracicaba, SP CEP 13414-903, Brazil (e-mail: cris\_salmon@yahoo.com.br).

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

(*Diagn Mol Pathol* 2012;21:120–126)

The advent of new technologies has enabled deeper insights into processes at subcellular levels, which will ultimately improve clinical outcomes. Laser capture microdissection (LCM) as a method of procuring subpopulations of cells or areas of interest under direct visual inspection using microscopy is playing an important role in this area.<sup>1,2</sup> The LCM technique uses infrared (IR) laser pulses to melt a polymer film to form a polymer cell composite, which is removed from the heterogenous tissue section by ultraviolet (UV) cutting of the selected area.<sup>3</sup> Combined with highly sensitive molecular assays, LCM became an important tool to derive precise information about the gene expression profile in situ.<sup>4</sup> The challenge of LCM is the preservation of morphologic characteristics needed to identify the areas of interest and also nucleic acid integrity required for many molecular techniques,<sup>3</sup> which are heavily dependent on sample preparation.

For measurement of gene expression, out of the available tissue-processing methods, frozen tissues are preferred over paraffin-embedded tissues because the former yield higher-quality RNA.<sup>5</sup> However, paraffin embedding of fixed tissue has been used routinely for tissue sections and not only provides excellent histologic details of soft and decalcified tissues but also has the advantage of easy handling and storage, in addition to allowing the reduction of the section thickness, which may improve LCM accuracy and efficiency when microdissecting cells located near hard tissues.<sup>6</sup> The limitations inherent to paraffin-embedded sample preparation are related to RNA degradation before and during fixation or caused by exposure to high temperatures during the paraffin-embedding process, with the possibility of continuous fragmentation over time.<sup>7</sup> In this sense, some studies have provided the field with valuable information on the feasibility of gene expression analysis performed in microdissected samples obtained from paraffin-embedded sections, and, in general, expression analysis of single and/or multiple genes has been reported to be possible in fixed microdissected samples.<sup>8–12</sup>

Currently, processing of mineralized tissues for molecular analysis of microdissected samples has become



an area of considerable interest. To date, molecular analysis of microdissected samples from mineralized tissues such as bones and teeth has mostly been limited to the developing stages of these organs, where a partially mineralized matrix allows the possibility of processing as frozen tissues. However, as development of bones and teeth proceeds, the increasingly mineralized extracellular matrix requires specific histologic processing, including use of fixatives and decalcification solutions to soften the tissue. Only limited information is currently available regarding the impact of histologic processing and decalcification on the quality and quantity of RNA harvested from microdissected samples. Although some studies have suggested that assay-quality RNA can be harvested from microdissected samples from mineralized tissues, a systematic controlled study is not available on the effect of standard processing procedures on nucleic acid recovery from decalcified sections after LCM. Thus, the aim of the current study was to compare and contrast an array of standard methods for processing decalcified tissues on gene expression from highly mineralized microdissected samples.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Sample Preparation

Adult Wistar rats (300 to 400 g body weight) were acquired and kept in plastic cages on a 12-hour light/dark cycle at 25°C to 30°C, with rodent chow and tap water ad libitum. The animals were housed in facilities at the Dental School of Piracicaba of the University of Campinas, and experimental procedures were approved by the University's Committee for Ethics in Animal Research (2160-1). The rats were randomly separated into 5 groups, and after anesthesia with ketamine (80 mg/kg, Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brazil) and xylazine (8 mg/kg, Rompun, Bayer, São Paulo, Brazil) they were killed by perfusion through the heart with one of the following fixative solutions: (1) methacarn (MET) (60% methanol, 30% chloroform, 10% acetic acid); (2) Protocol SafeFix II (Fisher Diagnostics, Middletown, VA); (3) Bouin's fixative solution (Fisher Diagnostics); (4) 10% neutral-buffered formalin; or (5) Protocol 10% buffered formalin (Fisher Diagnostics). Rat mandibles were dissected, incubated for 2 hours at 4°C in a similar solution used for perfusion, and then washed 3 times in phosphate-buffered solution for 30 minutes. Mandibles were decalcified in 20% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) at 4°C under agitation with 3 daily changes of solution for 15 days. After this period, samples were washed in phosphate-buffered solution, dehydrated in 3 changes of 30 minutes of absolute ethanol, incubated in 2 changes of xylene for 20 minutes, paraffin infiltrated for 2 hours, and embedded in paraffin. The paraffin blocks were stored at -20°C until use. A schematic illustration of the sample preparation steps is presented in Figure 1. In addition, unfixed fresh-frozen (FF) liver samples were used as controls to determine the impact of fixatives, decalcification and paraffin embedding on RNA integrity

after the sample preparation protocol, and laser microdissection.

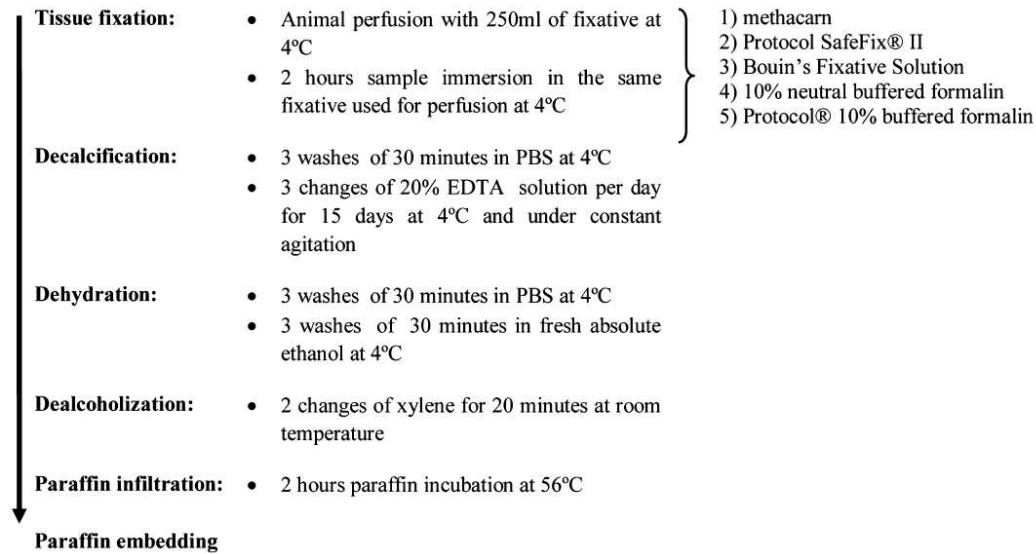
### Laser Capture Microdissection

Transversal sections of the first mandibular molar region were cut 7 µm thick and mounted on polyethylene naphthalate membrane glass slides (Applied Biosystem, Foster City, CA) for LCM. The slides were deparaffinized in 2 changes of xylene for 2 minutes and in 1 for 5 minutes, air dried inside the fume hood for 5 minutes, and immediately taken for microdissection. LCM was performed on 4 sections for each treatment group to capture periodontal ligament (PDL) cells using combined IR and the UV cutting laser of the Arcturus Microdissection Instrument (Applied Biosystem) (Fig. 2). Frozen 6 µm sections of liver samples were cut in a cryostat and microdissected after slide preparation by incubation in 75% ethanol for 1 minute, followed by 2 changes of RNase-free water, incubation in 75%, 95%, 100% ethanol for 30 seconds each, and final dehydration in xylene for 5 minutes. The microdissected frozen liver samples were used as a control group for RNA integrity analysis ("gold standard" samples). LCM settings were adjusted to capture the designed area of PDL and liver sections under a microscope (×10 magnification) as follows: UV cutting speed: 530 µm/s; IR laser strength of 65 to 70 mW, duration of 20 ms, spot size of 30 µm. A controlled microdissection time of 45 to 60 minutes was used for each slide. An estimated number of 16,400 and 12,500 cells were captured from the PDL and liver samples, respectively.

### RNA Isolation and Analysis of RNA Integrity

Total RNA was obtained from microdissected samples of PDL and frozen liver samples using column-based kits. The caps containing captured microdissected tissue were transferred and adapted to 0.5 mL tubes containing 50 µL of lysis extraction buffer. The tubes were inverted to immerse samples in lysis buffer of the RNA extraction kits and incubated as recommended by the manufacturer. The PicoPure RNA Isolation Kit (Applied Biosystem) was used for RNA extraction of ethanol-based fixed tissues (fixed in MET, Protocol SafeFix II, or Bouin's fixative solution) and frozen samples, whereas the Paradise RNA Isolation Kit (Applied Biosystem) was used for the formalin-fixed paraffin-embedded tissues samples (fixed in 10% neutral buffered formalin or Protocol 10% buffered formalin), as recommended by the manufacturer. All RNA samples were treated with DNase I to remove traces of contaminating genomic DNA. RNA concentration was assessed by spectrophotometry using NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, NC). RNA quality and yield were evaluated using an RNA 6000 Pico LabChip on an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The RNA Integrity Number (RIN) was obtained for each sample, in which a range from 1 to 10 indicated severely degraded to high-quality intact RNA.

## Tissue Preparation



## LCM Sample Preparation

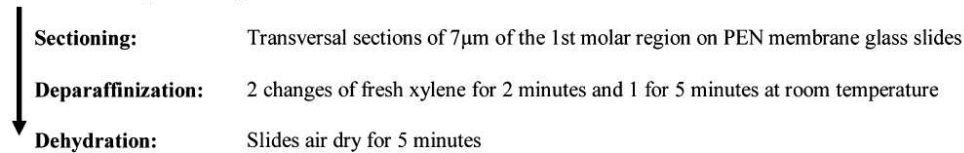


FIGURE 1. Schematic illustration of the methods used for sample preparation. EDTA indicates ethylenediamine tetraacetic acid; LCM, laser capture microdissection; PBS, phosphate-buffered solution.

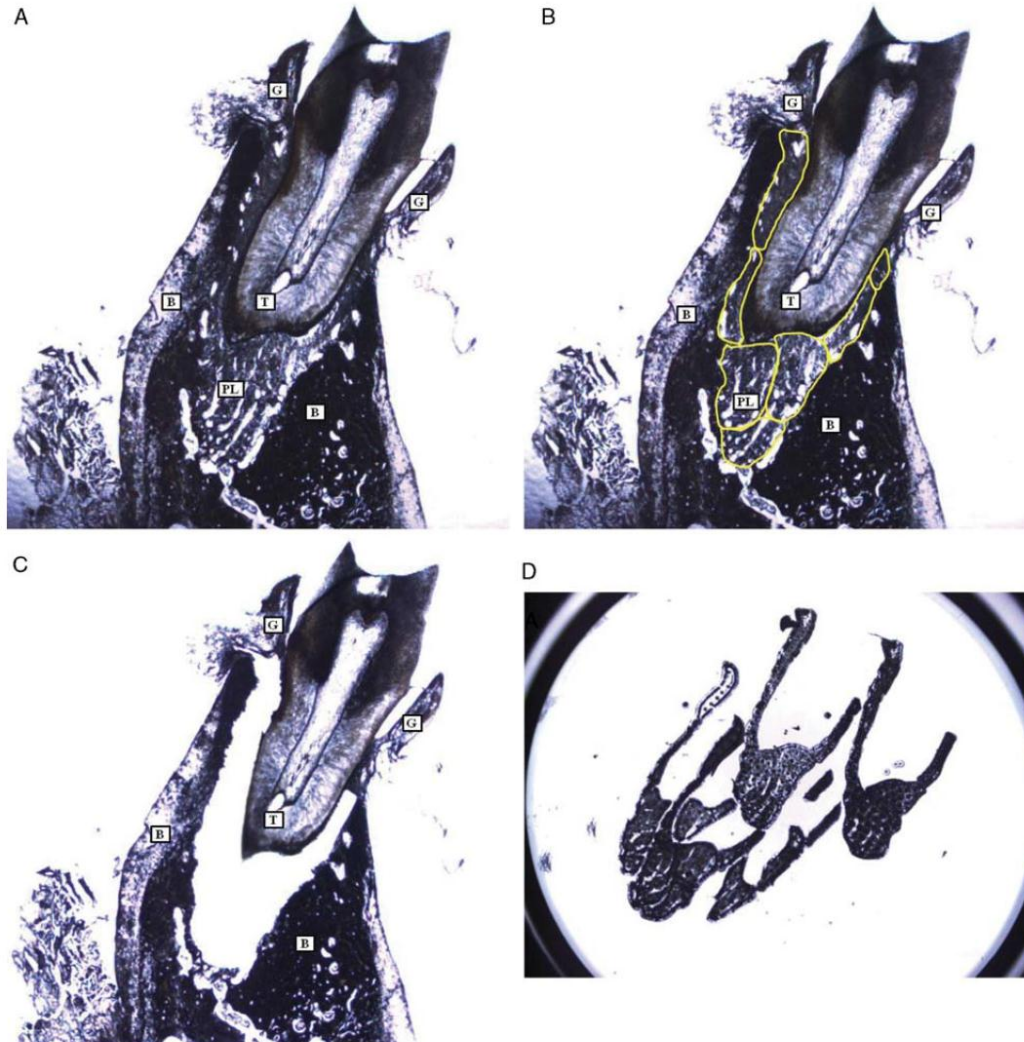
## Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RNA from microdissected samples was reverse-transcribed to cDNA using 5 ng of total RNA, random hexamer primers, and the SuperScript III First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen, Carlsbad, CA); cDNA was amplified by RT-PCR (LightCycler System, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) using Fast-Start DNA Masterplus SYBR Green I kit (Roche Diagnostics Co., Indianapolis, IN), following the manufacturer's recommendations, and with the reactions optimized for primers at 0.5 µM. Three different pairs of primers were designed for rat glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) to target fragments of 74, 163, and 396 bp (Table 1). The amplification profile was 1 cycle of preincubation at 95°C for 15 minutes, followed by 45 cycles at 95°C for 10 seconds, 55°C and 72°C for, respectively, 3/3 seconds (*Gapdh* 74), 3/6 seconds (*Gapdh*

163), 3/15 seconds (*Gapdh* 396). After amplification, 1 cycle of linear temperature gradient from 65°C to 95°C at a transition rate of 0.1°C/s was performed to assess the specificity of the PCR product by melting temperature determination. Water in place of cDNA was used as a negative control for these reactions. Electrophoreses of the PCR products was performed on a 2% agarose gel containing 0.5 µg/mL ethidium bromide in Tris-EDTA buffer (pH 8.0) at 90 V for 1 hour. A 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used as a fragment size reference and the gel was visualized under UV light.

## Statistical Analysis

Intergroup analysis by 1-way analysis of variance ( $\alpha = 0.05$ ), followed by the Bonferroni test, was performed to statistically assess the impact of the different experimental conditions on RNA yield and quality (BioEstat 5.0 software<sup>13</sup>).



**FIGURE 2.** Representative images of fixed decalcified sections of the first mandibular molar region before and after laser microdissection of the periodontal ligament (A–C). In (B), the ultraviolet cutting design for isolation periodontal ligament tissue is outlined in yellow. (C) The same histologic section after periodontal ligament was captured. (D) Microscopic image of the microdissected periodontal ligament tissues on the cap surface. B indicates bone; G, gingival tissue; PL, periodontal ligament; T, tooth.

**RESULTS**

**RNA Analysis**

To determine whether histologic processing would affect RNA yield and quality, RNA harvested from microdissected samples was assessed by spectrophotometry and Bioanalyzer (RIN score) for FF and decalcified, paraffin-embedded samples. Data analysis demonstrated

that RNA quantity obtained from the different experimental conditions was variable (Table 2). Among the fixed samples, no significant differences ( $P > 0.05$ ) in quantity of RNA extracted were found between the groups, although MET fixed and Bouin’s fixed samples showed a trend toward a higher and lower RNA yield, respectively. In addition, RIN values showed that standard histologic processing for decalcified sections resulted

**TABLE 1.** Oligonucleotide Primers Used for PCR

Rat <i>Gapdh</i> : 74 bp product	
Forward primer	5'-CATGTTCCAGTATGACTCTACCC-3'
Reverse primer	5'-TGATGACCAGCTTCCCATT-3'
Rat <i>Gapdh</i> : 163 bp product	
Forward primer	5'-GCCTTCTCTTGTGACAAAG-3'
Reverse primer	5'-TGGTGATGGGTTTCCCG-3'
Rat <i>Gapdh</i> : 396 bp product	
Forward primer	5'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-3'
Reverse primer	5'-AGTCTTCTGAGTGGCAGTGATG-3'

in variable levels of RNA degradation regardless of the procedure used. Comparison between the 5 groups of the present study demonstrated significantly higher RIN scores for the groups Bouin's fixed samples and Protocol 10% buffered formalin fixed samples, with the highest RIN score for the samples fixed with Protocol 10% buffered formalin showing an average of 2.4 ( $\pm 0.1$ ), whereas the lowest RIN value was 1.5 ( $\pm 0.9$ ) for the MET group. As expected, FF processed liver tissues (gold standard) presented a significantly higher quality of RNA (7.0  $\pm 0.3$ ) when compared with the other experimental conditions.

### Analysis of RT-PCR Reactions

Amplification of cDNA was successfully obtained by RT-PCR for most of the samples included in the present study. Although some level of RNA fragmentation was observed after histologic processing, biologically useful RNA was extracted with a minimum RIN value of 1.5 from the highly mineralized tissues. RNA fragments up to 396 bp were assayable by RT-PCR for the housekeeping gene *Gapdh*. Agarose gels demonstrated the effect of RNA fragmentation on RT-PCR amplification, showing that shorter targeted fragments of 74 bp were more efficiently amplified than the longer fragments of 163 and 396 bp (Fig. 3).

## DISCUSSION

In the present study, highly mineralized tissues were histologically processed by different methodologies, and RNA yield and quality were assessed from microdissected samples. LCM technology was used to capture cells/tissues from the PDL area in fixed, decalcified, and

paraffin-embedded sections, which are steps known to affect RNA quality<sup>7</sup> but required to allow histologic sectioning of hard tissues.<sup>14</sup> Five different fixative solutions were associated with a highly concentrated solution of 20% EDTA for tissue decalcification. Although EDTA is seldom used for clinical applications because of the longer time needed for decalcification, it is known for good preservation of morphology and RNA retention<sup>15,16</sup> when compared with many acidic solutions and was used here as a single tissue softener method to allow the comparison between the effects of each fixative on RNA preservation. Data analysis demonstrated that MET and SafeFix fixatives presented a slightly improved RNA recovery rate as compared with the other fixatives. In contrast, MET and SafeFix groups presented the lowest RIN values, indicating no correlation between these 2 parameters (yield and integrity) and corroborating with previous studies.<sup>17,18</sup> In addition, the use of Protocol 10% buffered formalin fixative combined with the Paradise RNA Isolation Kit allowed for the most consistent RNA harvesting and featured among the highest RIN values, with a maximum of 2.4. In the current investigation, data analysis additionally showed that amplification and detection of *Gapdh* (a housekeeping gene) was possible by RT-PCR reactions from samples with a minimum RIN value of 1.5, in agreement with previous studies indicating that a RIN value as low as 1.4 may still be successfully used for gene expression analysis.<sup>18,19</sup> The fragments of only 74 bp were successfully amplified in 100% of the RT-PCR reactions, whereas longer fragments (163 and 396 bp) were not as efficient for some samples fixed with ethanol-based fixatives.

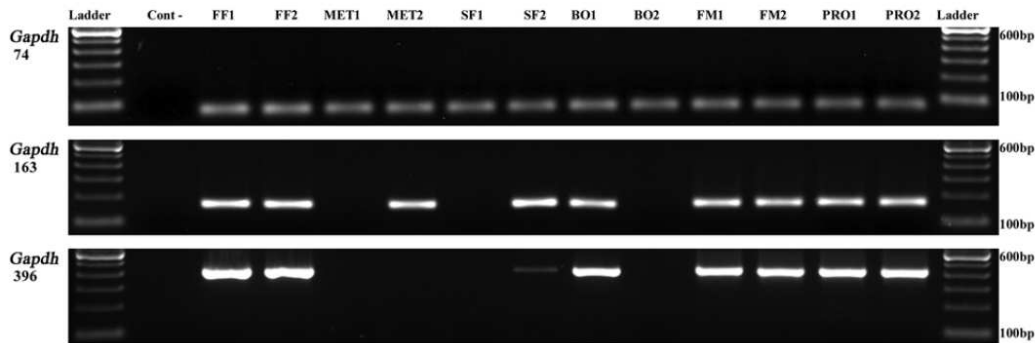
LCM has been developed as a powerful methodology in various fields, including in the area of mineralized tissues<sup>14,20,21</sup> for the study of oral embryology,<sup>22-24</sup> oral cell biology,<sup>25,26</sup> and tissue engineering.<sup>27,28</sup> Most of these studies were conducted on developing and partially mineralized matrices of bone or teeth that allowed the cell/tissue to be captured from frozen nondecalcified sections. In contrast, a very limited number of studies were conducted in highly mineralized tissues such as teeth,<sup>28,29</sup> possibly because of the lack of information on the impact of different methodological approaches on RNA integrity harvested from microdissected samples for further molecular analysis and the challenge of capturing cells located near hard tissues, such as osteoblasts, osteocytes, odontoblasts, and cementoblasts. Although few previous studies have used LCM technology to obtain pulp tissues from tooth to perform molecular analysis,<sup>30,31</sup> and therefore one can assume that assayable RNA was obtained, none of them have reported the effect of histologic processing on RNA yield and quality versus a "gold standard" control (FF sections). Therefore, the present investigation provides the first controlled evidence to support histologic processing of highly mineralized samples, including fixation, decalcification, and paraffin embedding, for further molecular analysis using the LCM technology.

On the basis of the points discussed above, it can be assumed that some degree of RNA degradation will occur

**TABLE 2.** Mean and Standard Deviation of RNA Quantity (Per Cut Area) and Quality [RNA Integrity Number (RIN)] Extracted From Microdissected Samples

Fixatives (n)	RNA/Cut Area ( $\mu\text{g} \times 10^{-3} / \mu\text{m}^2$ )	RIN
Fresh frozen (4)	33.37 $\pm$ 11.81a	7.0 $\pm$ 0.3a
Methacarn (6)	17.09 $\pm$ 11.45a	1.5 $\pm$ 0.9c
SafeFix (6)	14.86 $\pm$ 16.13a	1.8 $\pm$ 0.4bc
Bouin's (3)	7.65 $\pm$ 0.83a	2.2 $\pm$ 0.1b
10% Formalin (3)	13.37 $\pm$ 10.08a	1.9 $\pm$ 0.8bc
Protocol (3)	12.65 $\pm$ 9.11a	2.4 $\pm$ 0.1b

Different letters within the same column indicate intergroup significant difference by 1-way analysis of variance followed by Bonferroni test with  $\alpha$  set at 0.05.



**FIGURE 3.** Representative images of agarose gels of RT-PCR reaction products obtained from 3 independent runs for each tissue sample under different experimental conditions. Target fragments up to 74 bp of rat *Gapdh* were amplified for 100% of reactions including all fixative protocol groups, whereas longer fragments of 163 and 396 bp presented less consistent results. Methacarn-fixed and SafeFix-fixed samples are examples of loss of amplification efficiency among the different fragment sizes. BO indicates Bouin's fixative fixed; FF, fresh frozen; FM, formalin fixed; MET, methacarn fixed; PRO, protocol fixed; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SF, SafeFix fixed.

because of the histologic processing of highly mineralized tissues; however, biologically useful RNA can be harvested allowing for gene expression analysis even using a low quantity of total RNA for cDNA synthesis (5 ng) without previous RNA amplification. The findings of the present study may serve as an encouragement tool for those interested to further explore mechanisms involved in biological processes of hard tissues, such as development and regeneration, thus opening new perspectives for research and diagnostic investigation. However, future studies are needed to develop more specific reagents aiming at improving nucleic acid recovery from fixed and processed histologic samples.

In conclusion, although variable levels of RNA fragmentation should be expected, gene expression analysis can be performed from fixed and decalcified paraffin-embedded microdissected samples, with best results obtained for short-targeted fragments around 70 bp.

#### ACKNOWLEDGMENTS

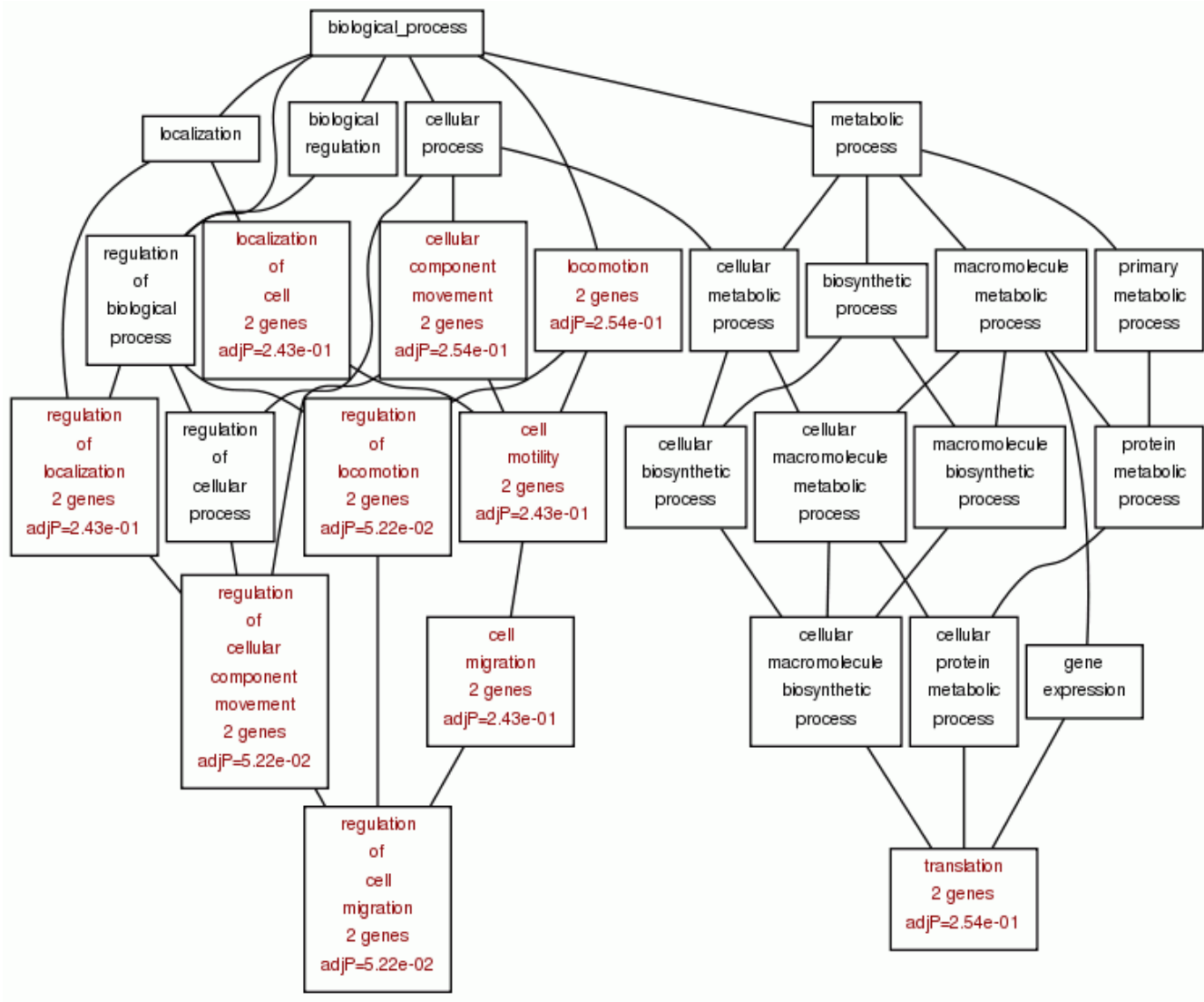
We thank Mariana P. F. Lazarim (State University of Campinas) for technical assistance with the histologic sectioning and Dr Brian L. Foster (University of Washington) for critically reading the manuscript.

#### REFERENCES

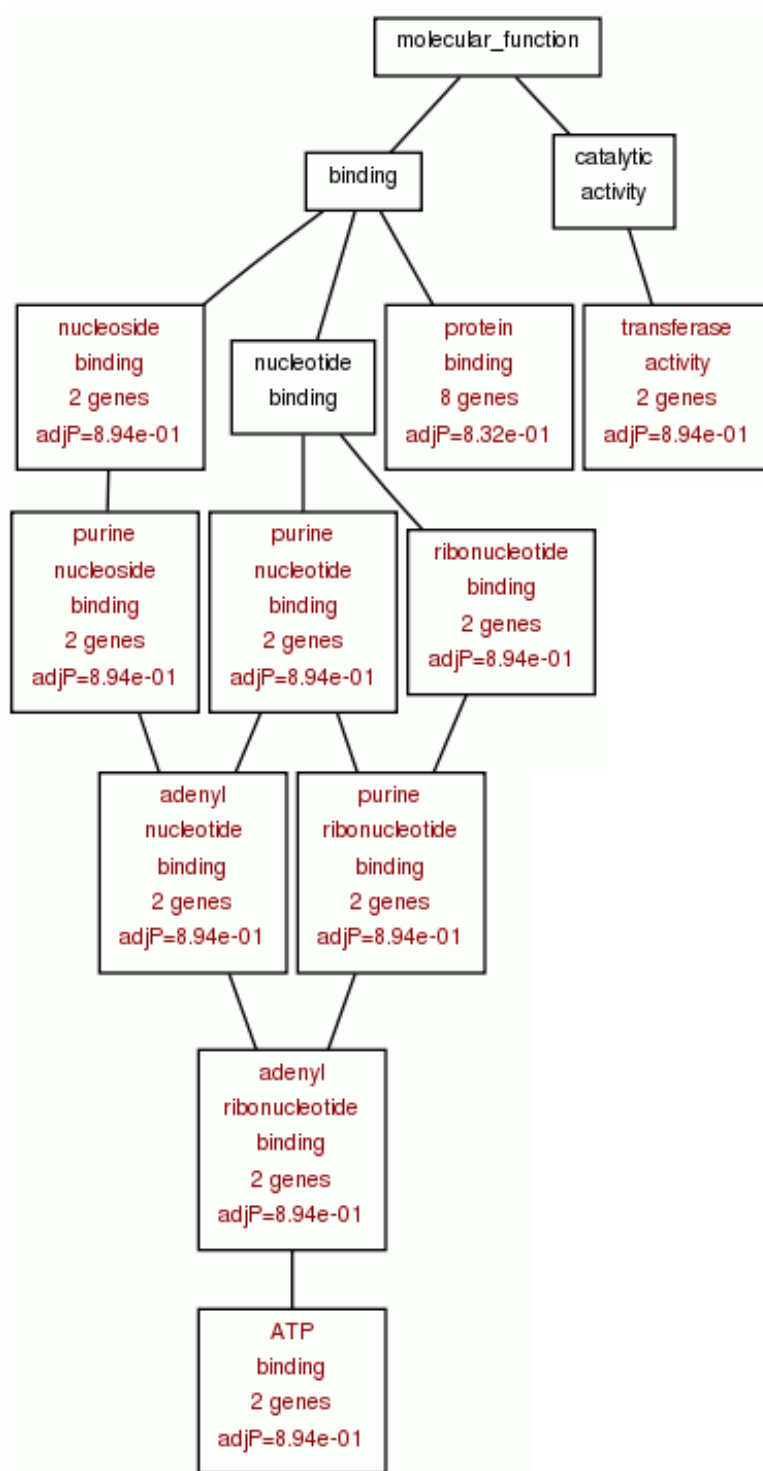
- Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, et al. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science*. 1997;278:1481-1483.
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection. *Science*. 1996;274:998-1001.
- Espina V, Wulfskuhle JD, Calvert VS, et al. Laser-capture microdissection. *Nat Protoc*. 2006;1:586-603.
- Kamme F, Zhu J, Luo L, et al. Single-cell laser-capture microdissection and RNA amplification. *Methods Mol Med*. 2004;99:215-223.
- Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, et al. Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol Carcinog*. 1999;25:86-91.
- Nakamura Y, Nomura Y, Arai C, et al. Laser capture microdissection of rat periodontal ligament for gene analysis. *Biotech Histochem*. 2007;82:295-300.
- Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, et al. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:4436-4443.
- Chung JY, Hewitt SM. An optimized RNA extraction method from archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Methods Mol Biol*. 2010;611:19-27.
- Coudry RA, Meireles SI, Stoyanova R, et al. Successful application of microarray technology to microdissected formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*. 2007;9:70-79.
- Farragher SM, Tanney A, Kennedy RD, et al. RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues. *Histochem Cell Biol*. 2008;130:435-445.
- Roberts L, Bowers J, Sensinger K, et al. Identification of methods for use of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples in RNA expression profiling. *Genomics*. 2009;94:341-348.
- Votavova H, Forsterova K, Stritesky J, et al. Optimized protocol for gene expression analysis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol*. 2009;18:176-182.
- BioEstai* [computer program]; Version 5.0. Belém, PA: Universidade Federal do Pará, 2007.
- Shao YY, Wang L, Hicks DG, et al. Analysis of gene expression in mineralized skeletal tissues by laser capture microdissection and RT-PCR. *Lab Invest*. 2006;86:1089-1095.
- Shibata Y, Fujita S, Takahashi H, et al. Assessment of decalcifying protocols for detection of specific RNA by non-radioactive in situ hybridization in calcified tissues. *Histochem Cell Biol*. 2000;113:153-159.
- Walsh L, Freemont AJ, Hoyland JA. The effect of tissue decalcification on mRNA retention within bone for in-situ hybridization studies. *Int J Exp Pathol*. 1993;74:237-241.
- Chung JY, Braunschweig T, Hewitt SM. Optimization of recovery of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol*. 2006;15:229-236.
- Ribeiro-Silva A, Zhang H, Jeffrey SS. RNA extraction from ten year old formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples: a comparison of column purification and magnetic bead-based technologies. *BMC Mol Biol*. 2007;8:118.
- Madabusi LV, Latham GJ, Andrus BF. RNA extraction for arrays. *Methods Enzymol*. 2006;411:1-14.

20. Ekuni D, Firth JD, Putnins EE. RNA integrity and in situ RT-PCR in dento-alveolar tissues after microwave accelerated demineralisation. *Arch Oral Biol*. 2006;51:164–169.
21. Kim JO, Kim HN, Hwang MH, et al. Differential gene expression analysis using paraffin-embedded tissues after laser microdissection. *J Cell Biochem*. 2003;90:998–1006.
22. Ida-Yonemochi H, Nakajima M, Saku T. Heparanase, heparan sulfate and perlecan distribution along with the vascular penetration during stellate reticulum retraction in the mouse enamel organ. *Arch Oral Biol*. 2010;55:778–787.
23. Matsunaga T, Yamamoto G, Tachikawa T. Expression of typical calpains in mouse molar. *Arch Oral Biol*. 2009;54:885–892.
24. Wise GE, Yao S. Regional differences of expression of bone morphogenetic protein-2 and RANKL in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci*. 2006;114:512–516.
25. Hoffmann M, Gaikwad J, Schmalz G, et al. Analysis of odontoblast gene expression using a novel approach, laser capture microdissection. *Connect Tissue Res*. 2002;43:376–380.
26. Kaneko T, Okiji T, Kaneko R, et al. Antigen-presenting x cells in human radicular granulomas. *J Dent Res*. 2008;87:553–557.
27. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008;34:962–969.
28. Young CS, Terada S, Vacanti JP, et al. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res*. 2002;81:695–700.
29. Kaneko T, Okiji T, Kaneko R, et al. Gene expression analysis of acutely traumatized pulps. *J Endod*. 2010;36:78–82.
30. Arai C, Nomura Y, Ishikawa M, et al. HSPA1A is upregulated in periodontal ligament at early stage of tooth movement in rats. *Histochem Cell Biol*. 2010;134:337–343.
31. Hayashi Y, Matsunaga T, Yamamoto G, et al. Comprehensive analysis of gene expression in the junctional epithelium by laser microdissection and microarray analysis. *J Periodontol Res*. 2010;45:618–625.

### Anexos 3-11

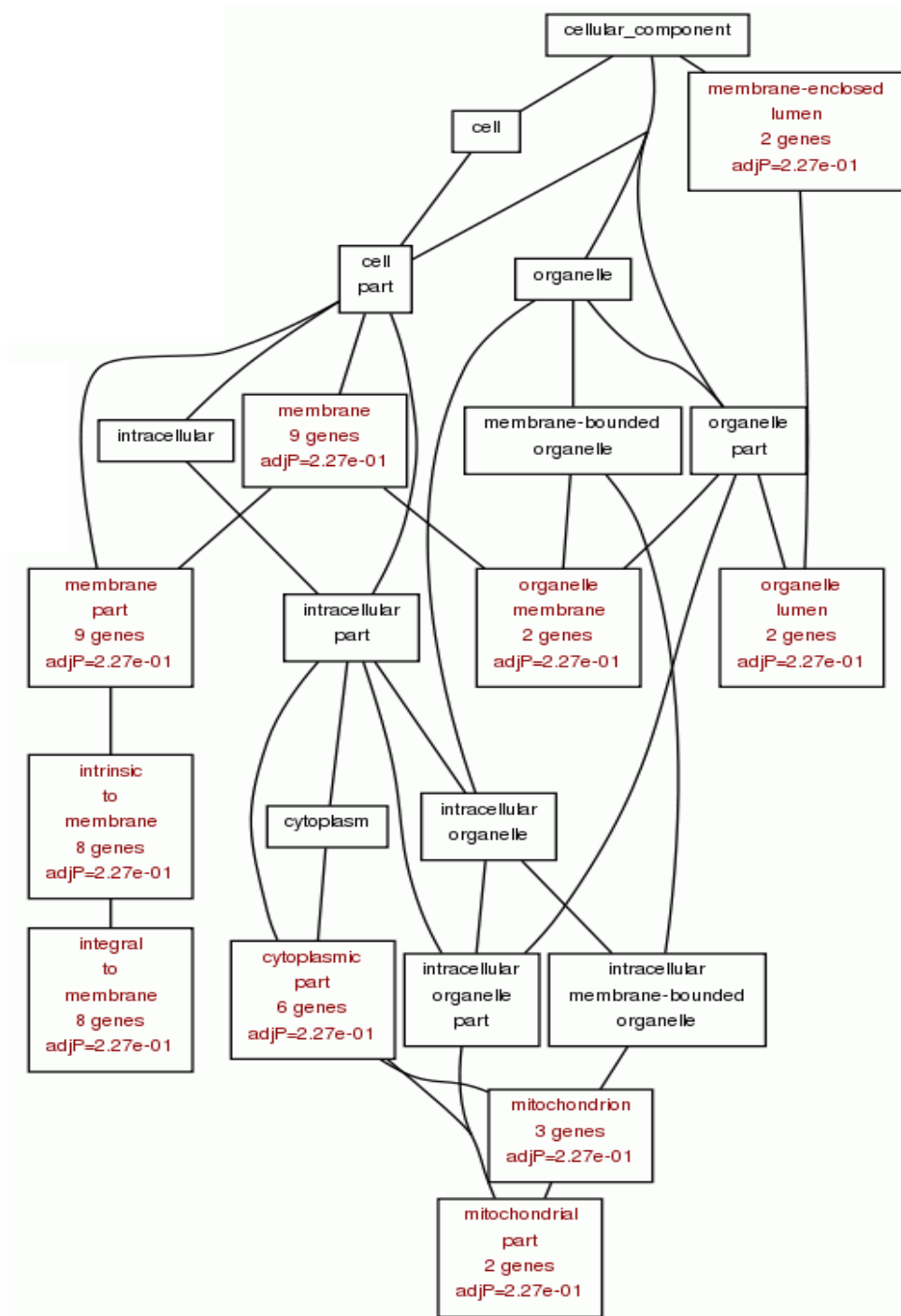


**Anexo3:** Análise da Ontologia Gêica (GO) de genes diferencialmente expressos para o período PN13 HERS na comparação PN13 HERS vs. PN13 através do gráfico acíclico direcionado (DAG). Na categoria Processo Biológico não há genes diferencialmente expressos ( $adjp \geq 0,05$ ).

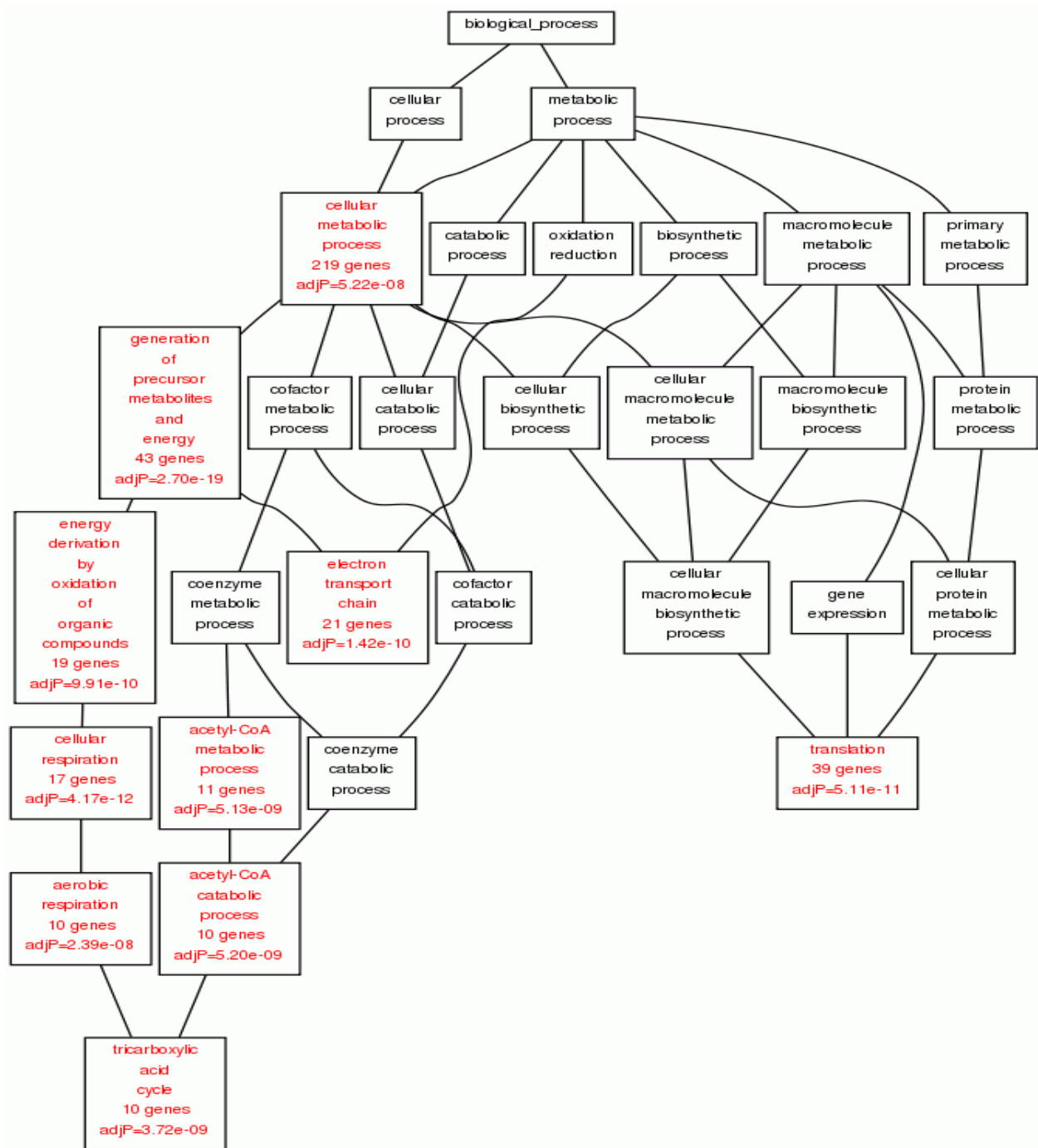


**Anexo 4:** Análise da Ontologia Gênica (GO) de genes diferencialmente expressos para o período PN13 HERS na comparação PN13 HERS vs. PN13 através do gráfico acíclico direcionado (DAG). Na categoria Função Molecular não há genes diferencialmente expressos ( $\text{adj}p \geq 0,05$ ).

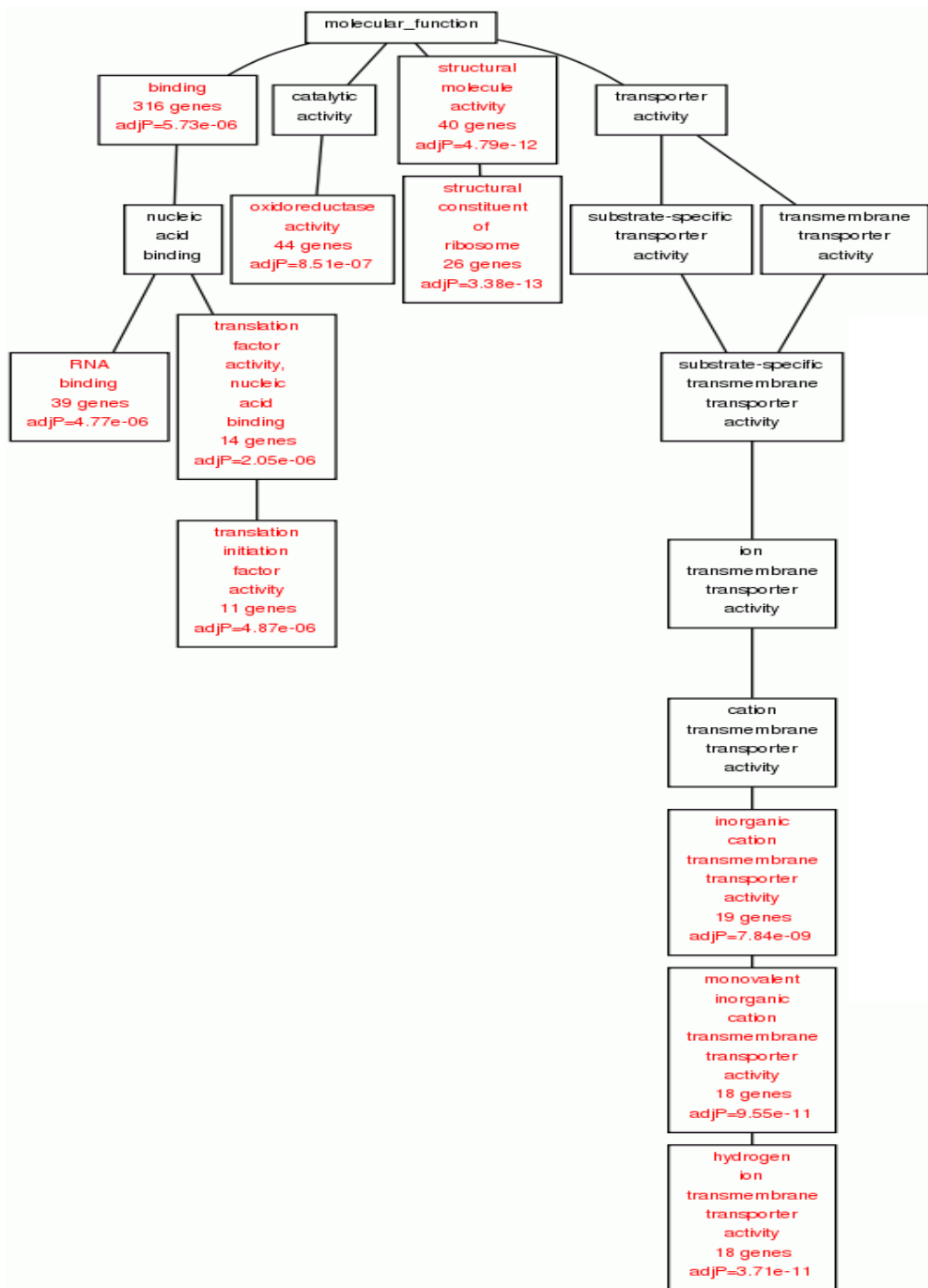




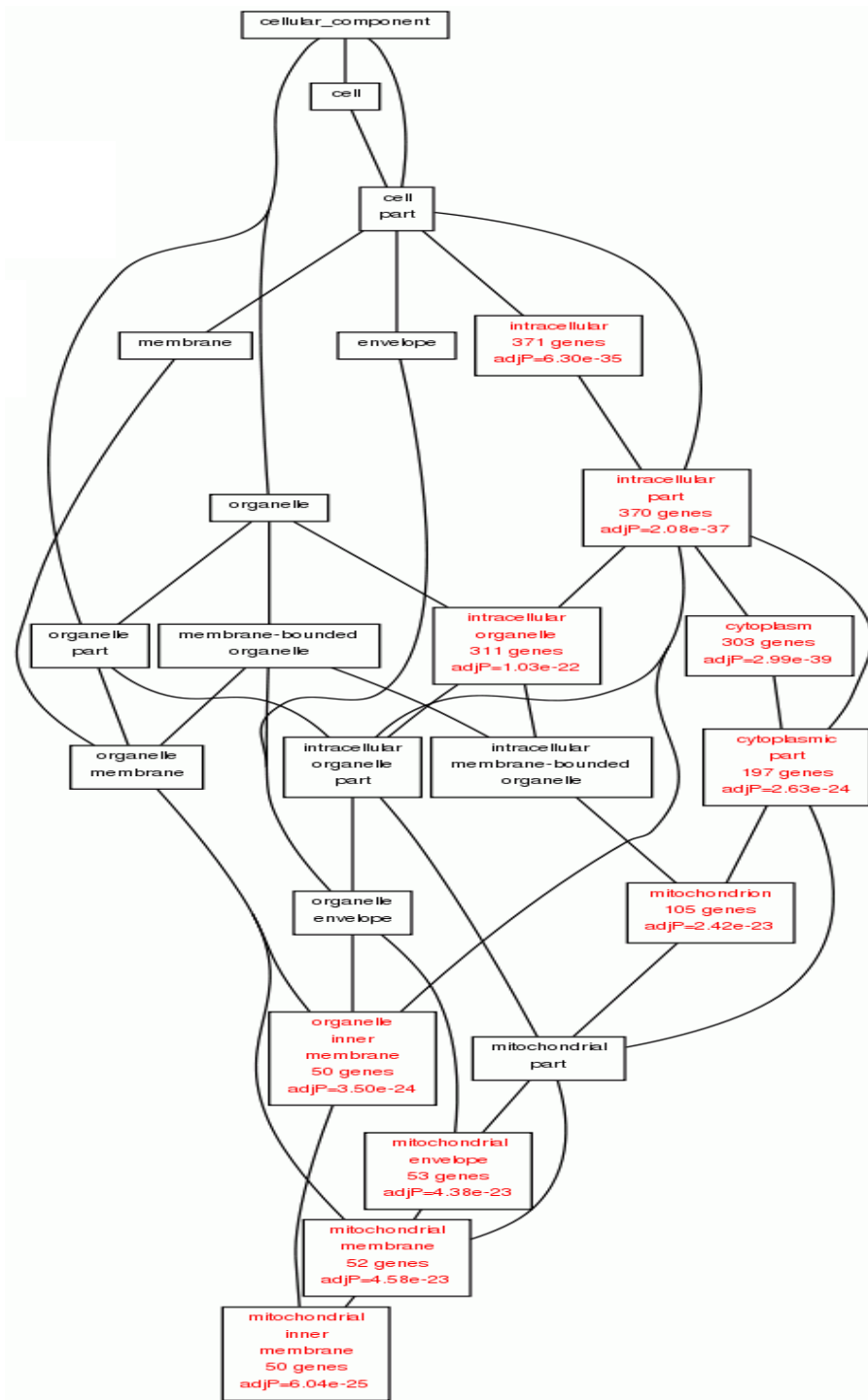
**Anexo 5:** Análise da Ontologia Gênica (GO) de genes diferencialmente expressos para o período PN13 HERS na comparação PN13 HERS vs. PN13 através do gráfico acíclico direcionado (DAG). Na categoria Componente Celular não há genes diferencialmente expressos ( $\text{adjP} \geq 0,05$ ).



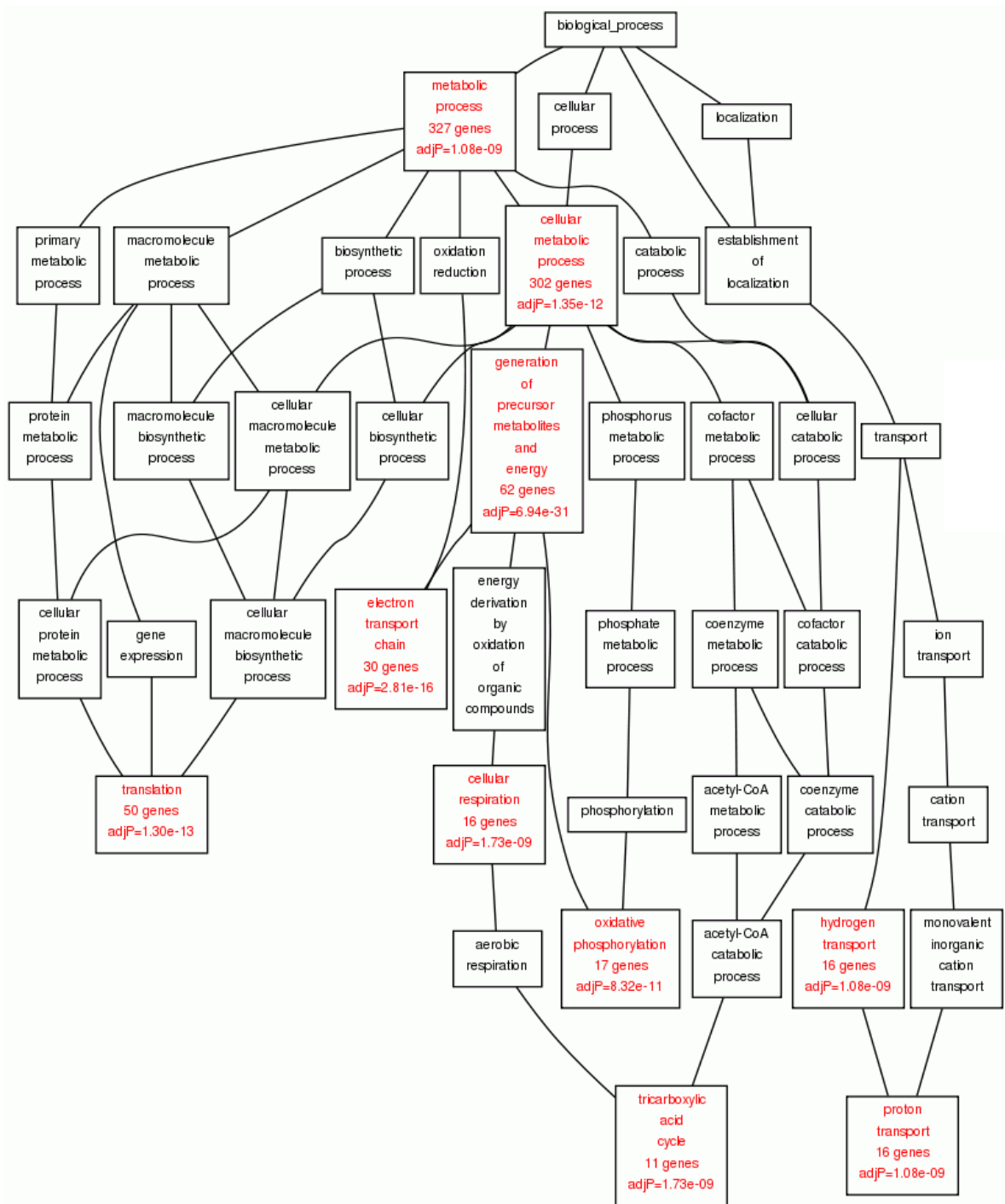
**Anexo 6:** Análise da Ontologia Gênica (GO) de genes diferencialmente expressos para o período PN13 na comparação PN13 HERS vs. PN13 através do gráfico acíclico direcionado (DAG). Na categoria Processo Biológico há genes diferencialmente expressos. As sub-categorias diferencialmente expressas ( $adjP \leq 0,05$ ) estão representadas pela cor ■ e contém a quantidade de genes diferencialmente expressos e as relações entre as proteínas e suas funções.



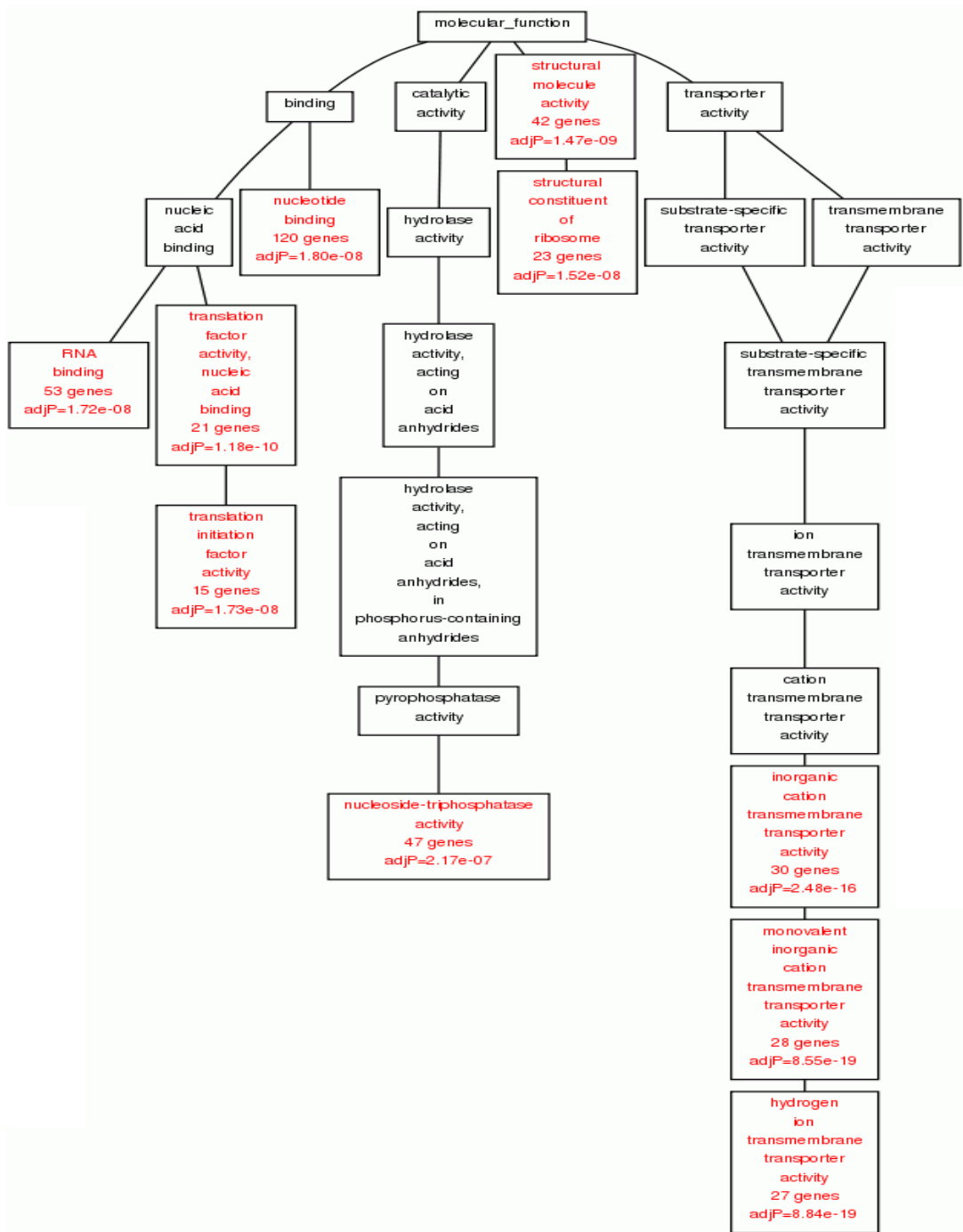
**Anexo 7:** Análise da Ontologia Gênica (GO) de genes diferencialmente expressos para o período PN13 na comparação PN13 HERS vs. PN13 através do gráfico acíclico direcionado (DAG). Na categoria Função Molecular há genes diferencialmente expressos. As sub-categorias diferencialmente expressas ( $adjp \leq 0,05$ ) estão representadas pela cor ■ e contém a quantidade de genes diferencialmente expressos e as relações entre as proteínas e suas funções.



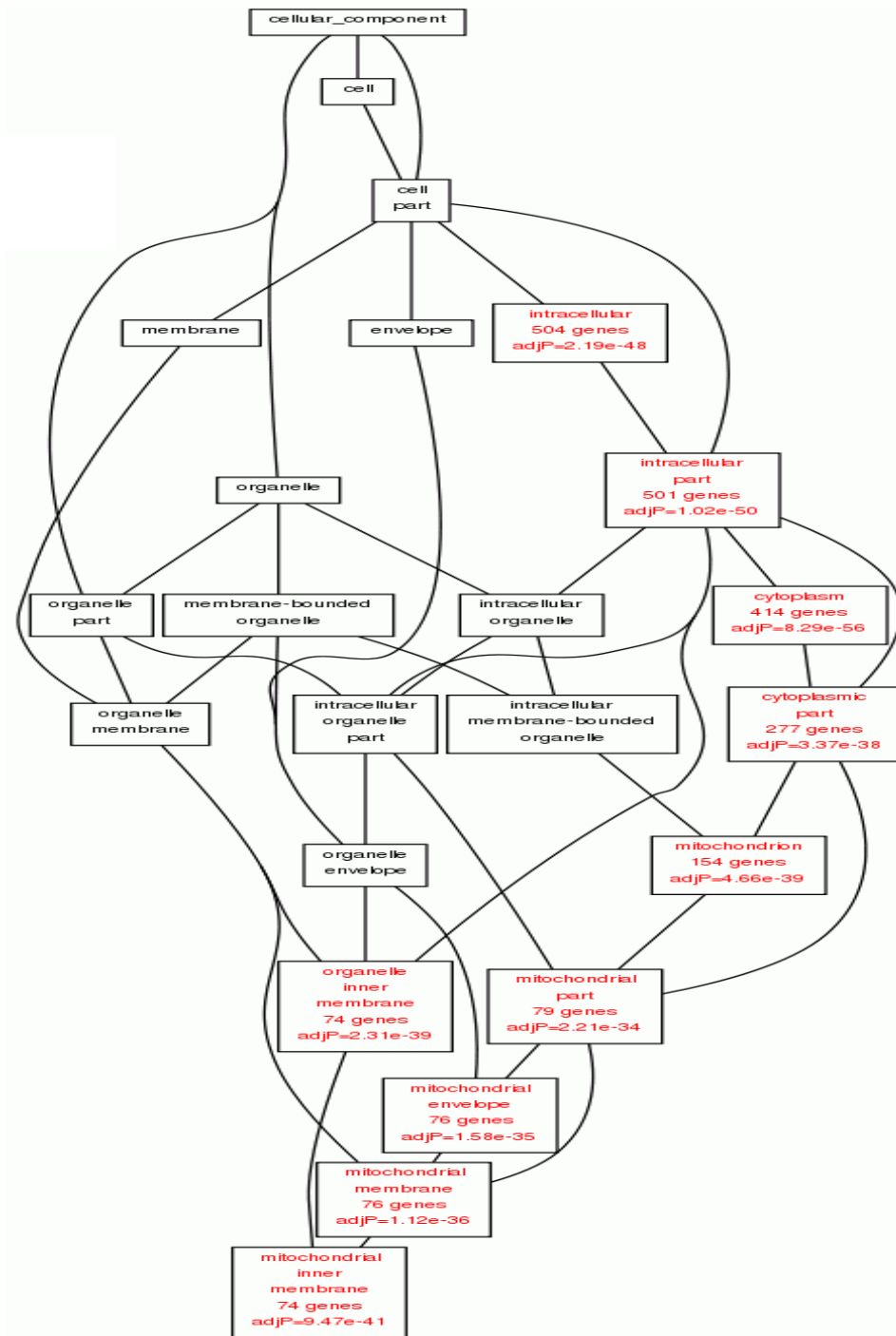
**Anexo 8:** Análise da Ontologia Gênica (GO) de genes diferencialmente expressos para o período PN13 na comparação PN13 HERS vs. PN13 através do gráfico acíclico direcionado (DAG). Na categoria Componente Celular há genes diferencialmente expressos. As sub-categorias diferencialmente expressas ( $adjP \leq 0,05$ ) estão representadas pela cor ■ e contém a quantidade de genes diferencialmente expressos e as relações entre as proteínas e suas funções.



**Anexo 9:** Análise da Ontologia Gênica (GO) de genes diferencialmente expressos para o período PN13 na comparação PN13 vs. PN45 através do gráfico acíclico direcionado (DAG). Na categoria Processo Biológico há genes diferencialmente expressos. As sub-categorias diferencialmente expressas ( $adjP \leq 0,05$ ) estão representadas pela cor ■ e contém a quantidade de genes diferencialmente expressos e as relações entre as proteínas e suas funções.



**Anexo 10:** Análise da Ontologia Gênica (GO) de genes diferencialmente expressos para o período PN13 na comparação PN13 vs. PN45 através do gráfico acíclico direcionado (DAG). Na categoria Função Molecular há genes diferencialmente expressos. As sub-categorias diferencialmente expressas ( $adjp \leq 0,05$ ) estão representadas pela cor ■ e contém a quantidade de genes diferencialmente expressos e as relações entre as proteínas e suas funções.



**Anexo 11:** Análise da Ontologia Gênica (GO) de genes diferencialmente expressos para o período PN13 na comparação PN13 vs. PN45 através do gráfico acíclico direcionado (DAG). Na categoria Componente Celular há genes diferencialmente expressos. As sub-categorias diferencialmente expressas ( $\text{adjP} \leq 0,05$ ) estão representadas pela cor ■.