



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Análise do padrão de metilação do DNA no gene *SOCS1* em pacientes com periodontite agressiva.

Trabalho de conclusão de curso- disciplina DS833

Aluna: Natália Buzoli Baptista

RA:103613

Piracicaba

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



Natália Buzoli Baptista

**Análise do padrão de metilação do DNA no gene
SOCS1 em pacientes com periodontite agressiva.**

Orientadora: Denise Carleto Andia

Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP

Piracicaba

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

B 229a	Baptista, Natália Buzoli, 1991- Análise do padrão de metilação no gene SOCS1 em pacientes com periodontite agressiva / Natália Buzoli Baptista. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2013.
	Orientador: Denise Carleto Andia. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
	1. Inflamação. 2. Periodontia. I. Andia, Denise Carleto, 1972- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Dedico este trabalho à minha avó, Antônia, que com alma pura e fé inabalável sempre se dedicou a toda família. Minha sincera gratidão.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, que tudo sabe e tudo fez em minha vida.

À minha família, especialmente minha mãe, meu exemplo, que apesar da distância e da saudade soube dar força me apoiar, sempre com muito carinho, e me fez seguir em frente e realizar todos os meus sonhos. Amo muito vocês.

Ao meu namorado, Diego, que com muita compreensão e paciência me apoiou durante os momentos de aflição durante todo esse período. Obrigada por tudo.

À minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Denise Carleto Andia, que com muita dedicação, paciência e amor, ao longo desses anos me ensinou tudo que consta neste trabalho. Sou muito grata pela confiança, apoio e orientação.

À FAPESP, pelo apoio financeiro à pesquisa realizada.

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Morfologia, área de Histologia da FOP/UNICAMP, que colaboraram com a pesquisa.

Aos amigos da turma, por todos os momentos vivenciados durante esses 4 anos, aprendemos, ensinamos, sorrimos e choramos. Todos juntos. Agradeço especialmente minhas amigas Mariana e Thaianne por todo apoio e amizade. Sentirei saudade!

RESUMO

Na periodontite, a inflamação representa uma resposta fisiológica complexa do hospedeiro a um desafio bacteriano específico. A metilação do DNA é uma modificação epigenética que possui papel fundamental na regulação da transcrição do gene *Supressors Of Cytokine Signaling (SOCS)-1*, que está intimamente relacionado com o controle da inflamação. A metilação do DNA tem se mostrado crítica na regulação de genes inflamatórios. Além disso, infecções podem ser consideradas como potenciais fatores epimutagênicos, capazes de remodelar o epigenoma. Neste contexto, qual seria o padrão de metilação do DNA no gene *SOCS1* em células presentes em um ambiente acometido pela inflamação e pela infecção? Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar o padrão de metilação do DNA no gene *SOCS1* em células do epitélio oral de indivíduos afetados pela periodontite agressiva generalizada (PAgr). Para tanto, DNA genômico das células epiteliais orais de 30 pacientes sem histórico de periodontite (grupo controle) e de 30 pacientes com periodontite agressiva (grupo PAgr) foram purificados e modificados pelo bissulfito de sódio e os padrões de metilação do DNA foram analisados com a técnica COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis). Os resultados apontam para uma desmetilação na região analisada do gene *SOCS1* (97,5 % para o grupo controle e 92,2 % para o grupo PAgr). Os pacientes com inflamação periodontal apresentam o DNA mais metilado nesta região, quando comparados aos pacientes do grupo controle ($p < 0,001$). O grupo controle apresentou maior frequência de pacientes com 100 % de desmetilação (83,3 %), comparados ao grupo PAgr (70,8 %). Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que os pacientes com inflamação periodontal apresentam a região analisada do gene *SOCS1* mais metilada e isso pode fazer parte de um controle epigenético de transcrição, relacionado a uma possível menor permissividade da região na transcrição do gene, nos pacientes com periodontite agressiva. Possivelmente, este padrão de metilação apresentado possa ser mais um fator a contribuir com o processo da periodontite.

Palavras-chave

Inflamação

Periodontite Agressiva

Epigenética

Gene *SOCS*

Metilação

Abstract

In periodontitis, inflammation is a complex physiological response of the host to a specific bacterial challenge. DNA methylation is an epigenetic modification that plays a critical role in the regulation of the gene transcription of suppressor of cytokine signaling (*SOCS*)-1, which translate a protein associated with inflammation control. DNA methylation has been shown to be critical in the regulation of inflammatory genes. In addition, infections can be considered as potential epimutagenic factors able to reshape the epigenome. Thus, what would be the DNA methylation status in cells that are present in an infected and inflamed environment? The aim of the present study was to verify the DNA methylation pattern of the *SOCS1* gene in oral epithelium cells of individuals affected by generalized Aggressive periodontitis (AgP). Genomic DNA from epithelial oral cells of 30 generalized AgP patients (AgP group) and 30 healthy patients (control group) were purified and modified by sodium bisulfite. DNA methylation patterns were analyzed using Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) for *SOCS1*. Although high frequencies of demethylation was observed for both groups (97,5% control group and 92,2% AgP group), the AgP patients presented low frequencies than the healthy patients, with significant difference between the groups ($p < 0,001$). In addition, the healthy patients were those who showed more complete demethylation (100%). AgP patients presented a higher frequency of methylation in the analyzed region of *SOCS1* and possibly, the methylation mechanism presented in this region might be another factor that participates in the disease process.

Keywords

Inflammation

Aggressive Periodontitis

Epigenetic Repression

Gene *SOCS*

Methylation

Sumário

1- Introdução	10
2- Revisão de literatura	11
3- Proposição	16
4- Materiais e métodos	16
5- Resultados	21
6- Discussão	24
7- Conclusão	28

1. Introdução

Periodontite é uma doença complexa e multifatorial que resulta do desequilíbrio entre a presença do biofilme oral e um mecanismo de defesa do hospedeiro diminuído (Flemming 1999; Cochram 2008). As principais características clínicas da doença, como inflamação gengival, formação de bolsa periodontal e perda de inserção clínica e óssea (Flemmig 1999; Cochram 2008) são resultantes das interações entre a resposta do hospedeiro e as espécies bacterianas.

A maioria dos casos de periodontite é causada por um pequeno número de espécies bacterianas, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. A quantidade e virulência dos microorganismos e os fatores de resistência do hospedeiro (fatores de risco e padrão de imunidade) são cruciais para o início e progressão da destruição periodontal (Detert et al. 2010). Este número limitado de bactérias específicas é essencial para o início da doença, porém, insuficiente para explicar totalmente a progressão e o grau de severidade de certas periodontites (Page et al. 1997).

A periodontite acontece em formas diferentes, sendo descrita como periodontite crônica ou periodontite agressiva, basicamente. A periodontite agressiva (PAgr) afeta pacientes jovens e normalmente com histórico familiar da doença. A doença manifesta-se com rápida perda de inserção e destruição óssea. Como é caracterizada como uma doença multifatorial, doenças sistêmicas, hábitos extrínsecos e ambientais podem interferir no curso e progressão da doença. A degradação dos tecidos periodontais está estreitamente relacionada a uma gama de eventos biológicos que incluem a complexa rede de citocinas pró e anti-inflamatórias, fatores de crescimento e enzimas. Estudos em animais e humanos indicam que fatores genéticos podem modificar a resposta inflamatória e imune, afetando a experiência da periodontite (Kinane, Shiba e Hart 2005).

Vários genes são responsáveis pela expressão de moléculas, como as citocinas, que participam e conduzem os mecanismos imuneinflamatórios do hospedeiro durante o curso da periodontite. Os genes da família *SOCS* (*Suppressors of Cytokines Signaling*) são genes reguladores de citocinas, sendo que

suas proteínas agem por meio de um “*negative feed back loop*” da via de sinalização “*Janus-kinase-signal transducer and activator of transcription*” (JAK/STAT), e participam do processo inflamatório da periodontite.

A família SOCS contém pelo menos oito proteínas (SOCS1 a 7 e *cytokine inducible SH2-domain-containing protein*). Devido a sua habilidade em diretamente inibir JAK, a proteína SOCS1 é um dos mais potentes inibidores da sinalização das citocinas (Babon e Nicola 2012). O gene *SOCS1* pode ser regulado em seus níveis transcricionais e pós-translacionais (Naka et al. 1997; Saito et al; 2000; Davey et al. 2006), sendo a metilação do DNA um mecanismo importante no controle dos níveis transcricionais. A metilação do DNA envolve a adição de um grupo metil ao anel de pirimidina da citosina localizada no contexto do dinucleotídeo CpG (Hartnett e Egan 2012). Quando a metilação ocorre em regiões regulatórias do DNA, é provável que ocorra uma regulação negativa ou um completo silenciamento da transcrição do gene, interferindo com o acesso dos fatores de transcrição ao DNA (Deng et al. 2001; Laird 2010).

Sabendo-se que a inflamação é parte essencial do curso da periodontite, que a proteína SOCS1 é uma das proteínas que participam da regulação da intensidade do processo inflamatório e que o promotor do gene *SOCS1* possui conteúdo elevado de dinucleotídeos CpG, torna-se muito importante a realização de estudos que possam elucidar o papel desses fatores dentro do processo inflamatório que se insere a periodontite.

2. Revisão de literatura

Periodontite agressiva

A periodontite agressiva (PAgr), usualmente afeta jovens saudáveis e promove uma rápida perda de inserção clínica e destruição óssea (Armitage1999). Possui pobre resposta às abordagens terapêuticas quando comparada à periodontite crônica. Entretanto, os mecanismos responsáveis por essas diferenças ainda não são completamente compreendidos. Ferramenta como a genômica pode esclarecer esses aspectos, gerando importantes informações a respeito da patogênese das doenças periodontais (Casarin 2013).

Essa condição apresenta baixa prevalência mundial, estando presente em aproximadamente 0,5 % da população jovem em países desenvolvidos (Albandar e Tinoco, 2002). Contudo em países em desenvolvimento, como o Brasil, essa patologia pode ser verificada em até 5% da população (Susin et al; 2005).

Caracterizada pela agregação familiar (Tonetti e Mombelli 1999), a PAgr também parece ser influenciada por doenças sistêmicas, fatores microbiológicos e ambientais, como por exemplo, o hábito de fumar, higiene oral, estresse e estilo de vida (Kinane, Shiba e Hart 2005). Porém, a característica de agregação familiar de seus casos indica que fatores genéticos podem ser importantes na susceptibilidade à doença (Tonetti e Mombelli 1999). A história familiar é considerada um dos principais critérios de diagnóstico na atual classificação da PAgr, sendo que o exame familiar pode ser usado como uma ferramenta preventiva de diagnóstico (Nibali et al. 2009). Fatores genéticos que influenciam e modificam a resposta imuneinflamatória do hospedeiro ao desafio bacteriano são os principais determinantes da susceptibilidade à periodontite e podem explicar os níveis de progressão e severidade da doença em certos indivíduos (Page et al. 1997), estando assim intimamente associados ao fenótipo clínico.

Suppressors of Cytokines Signaling (SOCS)

Altamente conservados entre as espécies, os genes *SOCS* compartilham uma homologia limitada aos outros membros da família, sugerindo que cada um possa ter papel específico (Starr e Hilton 1998). A transcrição gênica dos genes *SOCS* é ativada em resposta a uma série de componentes da cascata inflamatória, sendo que sua expressão, induzida por citocinas, fatores de crescimento e hormônios, pode ser mediada, pelo menos em parte, pelo ativador de transcrição STAT (Starr e Hilton 1998).

A citocina, quando ligada a seu receptor, resulta em agregação e ativação de JAK, levando a uma autofosforilação e a uma fosforilação do receptor, com subsequente ligação, fosforilação e ativação das proteínas STAT. As proteínas STAT fosforiladas, por sua vez, dimerizam e translocam para o núcleo para dar início à transcrição de genes de resposta às citocinas, como os genes *SOCS*. A proteína

SOCS1, por exemplo, quando no citoplasma, é capaz de inibir a transdução do sinal do receptor de citocina ou pela ligação de seu domínio SH2 à JAK kinase, inibindo a atividade de JAK, ou ligando diretamente ao resíduo de fosfotirosina do receptor ou ainda “marcando” proteínas para o complexo elongina BC para ubiquitinização e degradação proteossomal (Tan e Rabkin 2005; Yoshimura 2009; Babon e Nicola 2012).

O SOCS1 desempenha um papel crítico na modulação de citocinas e na sinalização associada com a inflamação e tem a capacidade de modular o equilíbrio entre os efeitos biológicos benéficos e deletérios (Davey, Heath e Starr 2006). No citoplasma, as proteínas SOCS inibem a transdução do sinal do receptor de citocina pela via JAK/STAT. Portanto, a via JAK/STAT ativa um mecanismo capaz de inibir a via de sinalização destas citocinas (Davey, Heath e Starr 2006), impondo um controle sobre a resposta disparada na célula pela citocina pela ação de um “*negative feedback loop*” (Alexander e Hilton 2004).

Embora oito proteínas SOCS sejam conhecidas, evidências claras têm mostrado que a participação de SOCS1 e SOCS3 é necessária para reduzir o excesso de sinalização promovido pela ativação dos receptores alvos (Alexander e Hilton 2004).

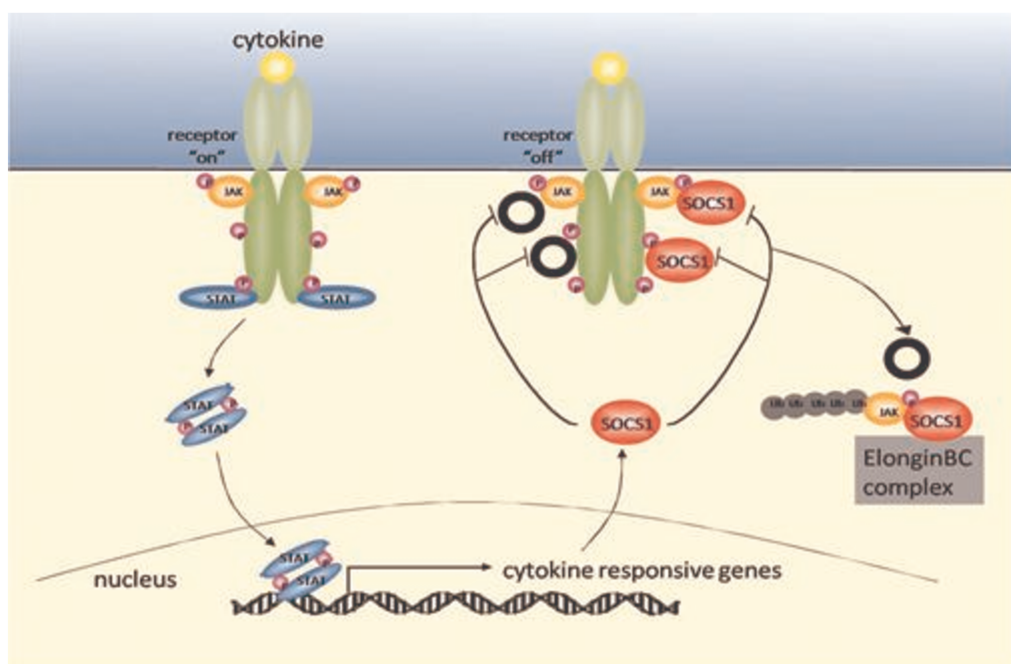


Figura 1. Esquema de ativação dos genes *SOCS* pela via de sinalização JAK/STAT e a proteína *SOCS* participando do “*negative feedback loop*”. Fonte: Davey, Heath e Starr, 2006.

Metilação da molécula de DNA

A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH_3) é transferido da S-adenosil-metionina para o carbono 05 de uma citosina que geralmente precede uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação de uma família de enzimas que recebem o nome de DNA-metiltransferases (DNMT) (Figura 2).

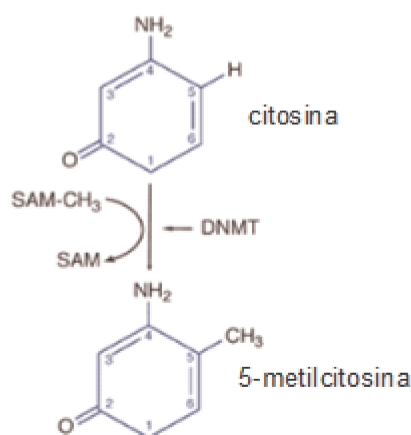


Figura 2. Esquema do processo de formação da 5-Metilcitosina (5-MeC) pela DNA metiltransferase.

A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG em células diferenciadas e tem uma importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma (Feinberg e Tycko 2004).

A metilação do DNA controla várias funções do genoma, como a recombinação durante meiose e mitose, controle da replicação, controle de DNAs “parasitas” que se inserem no genoma humano (ex.: DNA viral), estabilização e manutenção da expressão gênica, regulação da diferenciação celular, inativação do cromossomo X, sendo essencial durante a morfogênese para que ocorra desenvolvimento normal (Wolffe e Matzke, 1999; Suter et al. 2004).

A transcrição gênica pode ser fortemente inibida pela adição de radical metil. A presença de um “capuz” metil sobre uma citosina que precede uma guanina pode inibir a ligação de fatores de transcrição a estas regiões. A não ligação de fatores de

transcrição aos seus sítios específicos resulta na ausência de transcrição gênica. Não se sabe muito a respeito do papel dos genes *SOCS* no curso da periodontite. Porém, recentemente, alguns estudos que investigaram o papel destes genes nos tecidos periodontais foram realizados e estudaram a expressão dos *SOCS* -1,-2 e -3 em tecidos periodontais acometidos por periodontite crônica e gengivite crônica. (Garlet et al.2006).

Os padrões de metilação do DNA estão relacionados à estrutura da cromatina. Um DNA desmetilado está tipicamente associado a uma conformação ativa da cromatina enquanto que o DNA metilado está associado a uma cromatina inativa (Eilertsen et al., 2008). A presença dos dinucleotídeos CpGs metilados (meCpG) no promotor de um gene ou primeiro éxon pode ter um efeito em sua transcrição de maneira direta ou indireta (Turek-Plewa e Jagodziński, 2005). No mecanismo direto, a metilação nos CpGs é capaz de modular e/ou silenciar a expressão do gene, alterando a acessibilidade do DNA aos fatores de transcrição (TF) (Turek-Plewa e Jagodziński, 2005; Yang et al., 2010). O mecanismo indireto de regulação gênica é precedido por proteínas que possuem afinidade e reconhecem os meCpGs, bloqueando a interação dos fatores de transcrição com certas sequências de DNA ou por proteínas que formam complexos com outras proteínas de remodelamento de cromatina e estão envolvidas na estabilização da estrutura da heterocromatina (Turek-Plewa e Jagodziński, 2005).

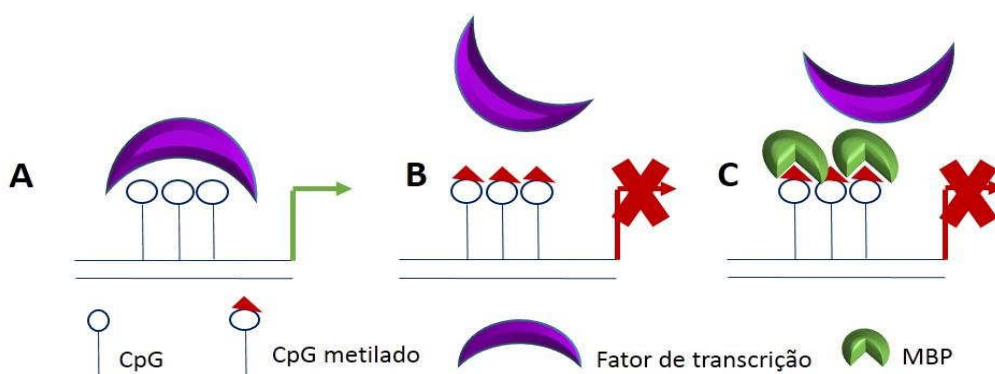


Figura 3. Inibição da transcrição gênica pela metilação. A. Região promotora desmetilada permitindo a ligação dos fatores de transcrição. B. Metilação impedindo a ligação dos fatores de transcrição. C. MBP - Proteínas que se ligam à metilcitosina em ilhas CpG bloqueiam a ligação dos fatores de transcrição

3. Proposição

Sabe-se que os fatores de transcrição da família STAT, juntamente com a metilação do DNA têm se mostrado críticos na regulação de genes inflamatórios (Medzhitov e Horng, 2009; Bayarsaihan, 2011), e que infecções são consideradas hoje potenciais fatores epimutagênicos, capazes de remodelar o epigenoma (Barros e Offenbacher, 2009; Bierne et al. 2012). Associado a estes fatores, o gene *SOCS1* atua na regulação da intensidade do processo inflamatório, sendo a metilação do DNA um dos mecanismos de regulação da sua transcrição. Estas observações levaram ao questionamento sobre qual seria o padrão de metilação do DNA no gene *SOCS1* em células presentes em um ambiente oral contaminado e inflamado. Portanto, a proposição deste estudo foi verificar o padrão de metilação do DNA no gene *SOCS1* nas células do epitélio oral de indivíduos afetados pela periodontite agressiva generalizada.

4. Materiais e Métodos

Os indivíduos selecionados para o estudo foram: brasileiros, sistemicamente saudáveis, caucasianos, de ambos os gêneros e não fumantes (nunca fumaram). Todos os pacientes receberam exame intra oral e periodontal, incluindo índice de placa boca toda (Ainamo e Bay, 1975) e índice de sangramento boca toda (Mühlemann e Son, 1971), mobilidade dental, exame radiográfico e questionários completos dentários e médicos.

O diagnóstico de periodontite agressiva generalizada foi feito seguindo o sistema da Academia Americana de Periodontia, de acordo com a Classificação das Doenças Periodontais de 1999 (Armitage, 1999):

1. Grupo controle (n = 30 pacientes): Pacientes com ausência de sítios com perda de inserção clínica e profundidade de sondagem < 3 mm, com ausência de mobilidade dentária e com escore de sangramento boca toda (full-mouth bleeding score - FMBS) até 25%; idade entre 21 e 34 anos (para parear com a idade dos pacientes com periodontite agressiva).

2. Grupo periodontite agressiva (n = 30 pacientes): Pacientes com bolsas periodontais com perda de inserção clínica e perda óssea radiográfica em pelo menos 3 dentes (excluindo os primeiros molares e incisivos) e pelo menos 8 dentes com profundidade de sondagem > 5mm e sangramento à sondagem. Pelo menos 2 dos 8 dentes qualificados com profundidade de sondagem > 7 mm; idade entre 21 e 34 anos.

O presente estudo foi enviado ao Comitê em Ética da FOP – UNICAMP (número do protocolo 130/2011) e todos os pacientes assinaram o termo de informação e consentimento livre e esclarecido para a participação voluntária na pesquisa científica, de acordo com as normas do Comitê em Ética da FOP – UNICAMP. Fumantes, diabéticos, grávidas ou em período de lactação, com histórico médico de doença auto-imune, com história de hepatite e infecção por HIV ou com pré-medicação antibiótica recente como também uso crônico de anti-inflamatórios e indivíduos com histórico de GUN (Gengivite Ulcerativa Necrosante) não foram incluídos na amostra.

As medidas de profundidade de bolsa e nível de inserção clínico foram realizadas em seis áreas ao redor de cada dente. Os parâmetros clínicos foram obtidos por um examinador calibrado (DCA; correlação intra-classe = 0.93).

A pesquisa foi realizada no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Morfologia, área de Histologia da FOP/UNICAMP.

Calibração

Inicialmente, um total de 3 indivíduos apresentando PAgr generalizada, mas que não participaram do estudo, foram selecionados. O examinador (DCA) mediu o nível de inserção clínico relativo (RCAL), que é a distância do fundo da bolsa à margem do *stent*, e profundidade de bolsa, duas vezes em todos os pacientes, em um intervalo de 24 horas entre os exames. A correlação intra-classe foi calculada para cada parâmetro, resultando em 93% para ambos. Esta calibração foi repetida a cada três meses.

Análise genética

Isolamento do DNA genômico

A coleta e processamento das amostras de células epiteliais bucais foram realizados de acordo com o protocolo descrito em Trevilatto & Line, 2000. Foi coletado o bochecho dos pacientes em solução de dextrose 3%. As amostras foram mantidas congeladas em -20°C até o momento da extração e purificação do DNA, realizada com fenol/clorofórmio e precipitação em sal/etanol. O DNA foi ressuspensionado em 50 µl de água estéril e em seguida sua concentração e pureza foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, na razão OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

Conversão do DNA pelo Bissulfito de sódio

Na molécula de DNA submetida à conversão pelo bissulfito de sódio, as citosinas metiladas permanecem como citosinas e as citosinas não metiladas são transformadas em uracila e depois lidas como timinas na reação de PCR. Esta metodologia foi realizada por meio do kit methylSEQr™ Bisulfite Conversion kit (Applied Biosystems). O *input* de DNA para a conversão é de 300 ng, sendo que o volume final é de 50 µL e, portanto, obtêm-se 6 ng/µL de DNA convertido, pronto para ser amplificado.

Desenho dos primers e escolha das enzimas de restrição

O desenvolvimento da técnica iniciou-se pelo desenho dos primers. A sequência original do gene *SOCS1* foi convertida pelo programa Methyl Primer Express v.1.0 (Applied Biosystems), que nos dá ambas as possíveis sequências: metilada e não metilada. A partir disto, um trecho próximo à caixa de início de transcrição do gene foi escolhido, por ser uma região regulatória e, portanto, susceptível ao controle epigenético. Segundo a técnica Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA), o trecho a ser amplificado não deve ser muito extenso, devido às degradações inerentes ao tratamento com o Bissulfito de sódio e os primers devem ser livres de dinucleotídeos CpG, para garantir igual reconhecimento do DNA, não importando o seu status original de metilação. Estas características restringem bastante a escolha do trecho para análise. Os primers

puderam ser encaixados na região promotora do gene, próximo ao sítio de início de transcrição, gerando um amplicon de 221pb. Em seguida, este trecho foi pesquisado em mapas de restrição pelo NEBcutter v.2.0 (New England Biolabs). O acesso a este programa nos deu algumas opções de enzima de restrição para as reações de digestão, tanto para a condição originalmente metilada quanto para a originalmente não metilada do DNA. Para digerir o DNA em uma possível sequência metilada (mantida como CG mesmo após a conversão pelo bissulfito de sódio), a enzima escolhida foi a *Bst*UI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), e para a possível sequência não metilada, a enzima *Hph*I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA).

Seguem os trechos em ambas as condições, o posicionamento dos primers, as enzimas escolhidas e os locais de digestão.

Foward: GTAGTTTTTATAGTAGTAGAGTTT

Reverse: CTCAAAACCCCAATAAAATC

Amplicon: 221pb

Sequência não metilada: *Hph*I (GGTGA): fragmentos de 130pb e 91pb

GTAGTTTTTATAGTAGTAGAGTTTGATGGTGGTTAGAATTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTGTTTGTGGTTTTGTGTGTTTGTGGTTGTGTTTTGTGGTTTTGGTTTT
GGTTTTTGGTGAATATGTTTTTGTATATTTGTTTGTATGTTGATTATTGGTGTATT
ATGTGTGTTAGTGTGTTTTTGGATGTTGTGGATTTTATTGGGGGTTTTTGAG

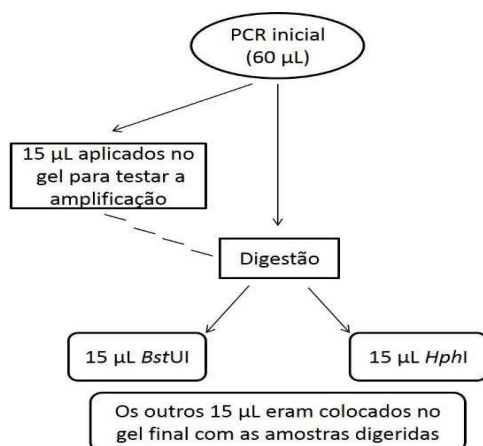
Sequência metilada: *Bst*UI (CGCG): fragmentos 74pb, 67pb e 40pb e outros menores

GTAGTTTTTATAGTAGTATAGTTTCGACGGCGGTTAGAATTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTCGTTCGCGGTTTTCGCGCGTTCGCGGTCGTGTTTCGCGGTTTCGGTTTCG
GTTTTCGGCGATACGTTTTTTCGTATATTTTCGTTTCGTACGTTCGATTATCGGCGTAT
TACGCGCGTTAGCGCGTTTTTGGACGTTTGCGGATTTTATTGGGGGTTTTTGAG

Amplificação do DNA tratado com bissulfito de sódio

Após os testes de ciclagem e temperatura de anelamento, optamos por realizar uma PCR inicial de 60 µL, para que todas as reações subsequentes pudessem ser realizadas a partir desta única PCR. As condições da PCR foram as seguintes: 30

μL Go Taq Green Master Mix (Promega Corporations, Madison, Wi, USA), 2,4 μL de cada primer (10 μM), 30 ng de DNA convertido (5 μL) e 20,2 μL de água, em termociclador Applied Biosystem, em 28 ciclos de: 1 min a 95^o C, 45seg a 51^o C para anelamento dos primers, 1 min a 72^o C, seguida de extensão final de 7 min a 72^o C. Após as ampliações nas PCRs iniciais, foram corridos géis de poliacrilamida a 10 % para verificação da amplificação de todas as amostras, com 15 μL do volume total de 60 μL . Desta forma foi possível avaliar a amplificação de todas as amostras.



Análise de metilação pelo método COBRA

Em seguida à amplificação positiva dos fragmentos, seguiu-se a digestão dos mesmos pelas 2 enzimas escolhidas: *BstUI* para digestão das sequências metiladas e *HphI* para a digestão das sequências não metiladas. As condições das reações de digestão foram as seguintes:

BstUI – 15 μL do amplificado, 2 μL de Buffer 4 (10 x), 0,4 μL da enzima e 2,6 μL de água, com volume final de 20 μL . As amostras ficaram em reação overnight a 60 °C.

HphI – 15 μL do amplificado, 2 μL de Buffer 4 (10 x), 0,8 μL da enzima e 2,2 μL de água, com volume final de 20 μL . As amostras ficaram em reação overnight a 37 °C.

As amostras foram posicionadas na seguinte ordem no gel de poliacrilamida a 12 %: primeiro a amostra em questão, amplificada e sem digestão (controle 100 %), na canaleta ao lado, a mesma amostra só que digerida pela enzima *BstUI* e em

seguida, na próxima canaleta, novamente a mesma amostra, porém digerida pela enzima *HphI*. Desta maneira, cada amostra a ser comparada entre si e quantificada pelo Scion Image (Scion Corporation, MD, USA) ficava em um mesmo gel. As amostras foram coradas com Gel Red™ (Biotium), utilizando solução mãe diluída 500 vezes e adicionando 2,0 µL desta solução a cada amostra a ser aplicada no gel.

5. Resultados

Para avaliar os resultados, foi usado o programa Scion Image (Scion Corporation, MD, USA) que quantificou cada banda com a quantidade de pixels, que foi convertido em uma porcentagem, permitindo assim a comparação entre elas. A banda da PCR no gel foi adotada como 100 %. Algumas amostras apresentaram uma permanência de DNA não digerido pela *HphI*, sugerindo uma porcentagem de células metiladas. Ao mesmo tempo, em algumas amostras, notamos uma ligeira diminuição na banda digerida pela *BstUI*, o que pode confirmar essa pequena porcentagem de moléculas metiladas nas amostras. A partir deste panorama, as porcentagens de digestão de ambas as enzimas foram calculadas e a estatística realizada a partir das porcentagens obtidas pela digestão da *HphI* (desmetilação).

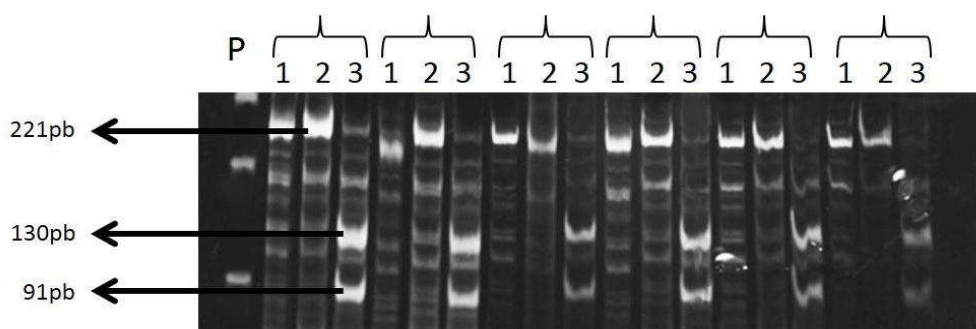


Figura 4. 1: DNA convertido por bissulfito de sódio e amplificado por PCR. **2:** DNA convertido por bissulfito de sódio, amplificado por PCR e digerido pela enzima *BstUI*. **3:** DNA convertido por bissulfito de sódio, amplificado por PCR e digerido pela enzima *HphI*. **P:** Padrão/marca de massa molecular de 100pb.

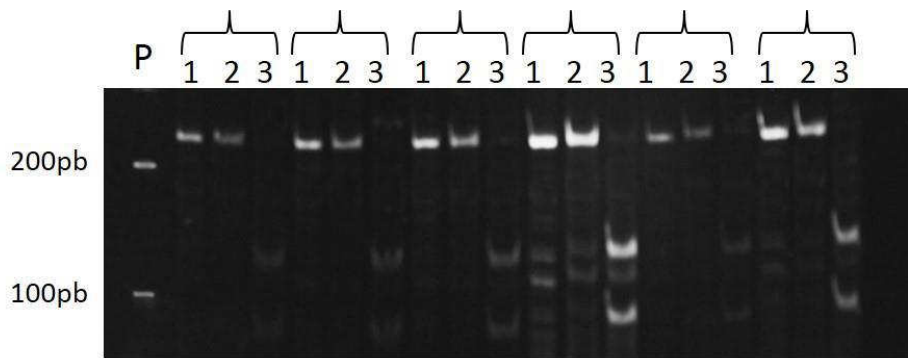


Figura 5. 1: DNA convertido por bissulfato de sódio e amplificado por PCR. **2:** DNA convertido por bissulfato de sódio, amplificado por PCR e digerido pela enzima *Bst*UI. **3:** DNA convertido por bissulfato de sódio, amplificado por PCR e digerido pela enzima *Hph*I. **P:** Padrão/marcador de massa molecular de 100pb.

O gráfico 1 mostra a distribuição do padrão de desmetilação entre os grupos. Os resultados demonstraram uma porcentagem grande de desmetilação das células em ambos os grupos (controle 97,5% x periodontite agressiva 92,2%), com diferença estatisticamente significativa para o grupo de pacientes do grupo controle ($p < 0.001$).

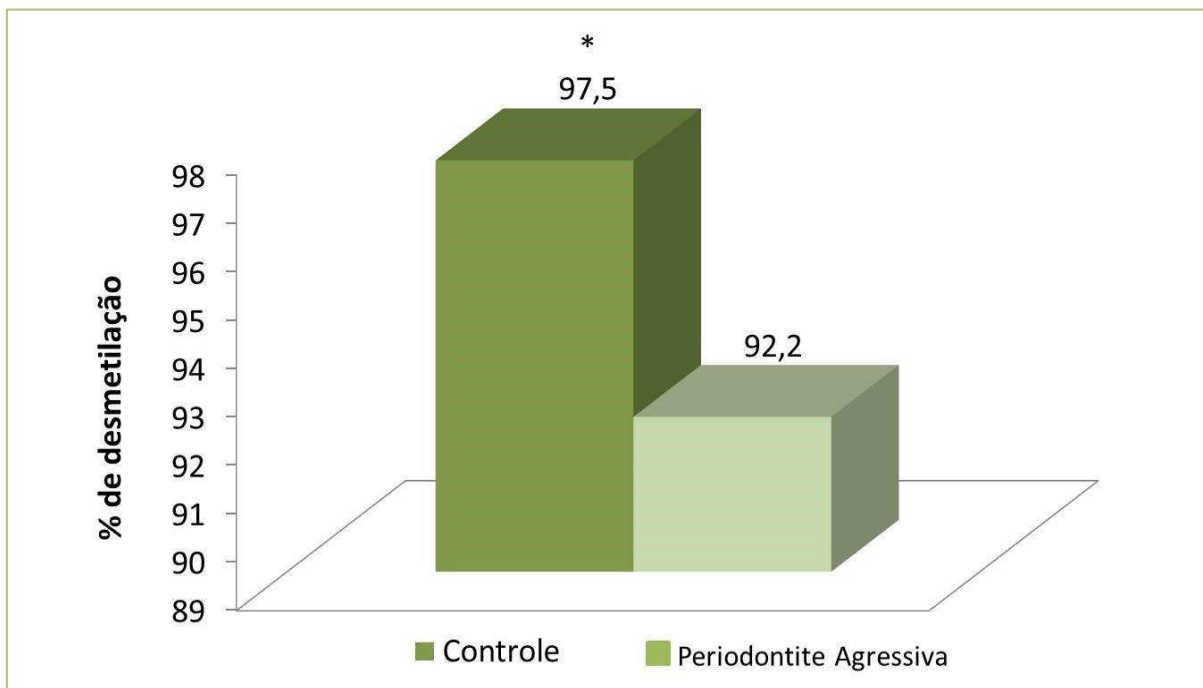


Gráfico 1. Porcentagem média de desmetilação encontrada nos grupos controle e periodontite agressiva.

A frequência de pacientes que apresentavam 100% de desmetilação no trecho de DNA analisado do gene *SOCS1* está apresentada no gráfico 2. Os resultados

demonstram que a maior frequência de 100% de desmetilação está localizada no grupo de pacientes sem histórico de doença periodontal agressiva, corroborando os resultados apresentados no gráfico1. Embora tenha havido uma diferença numérica entre os grupos (controle 83,3% x periodontite agressiva 70,8%), esta diferença não foi estatisticamente significativa.

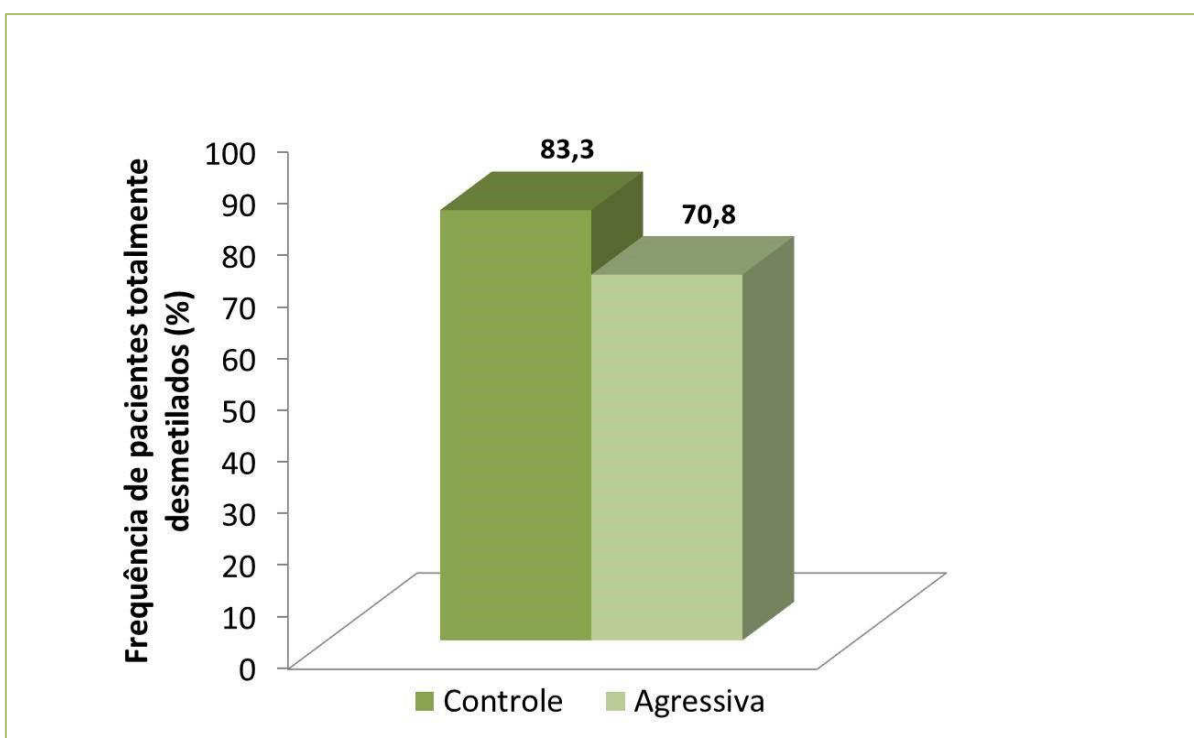


Gráfico 2. Frequência de pacientes com o fragmento analisado do gene *SOCS1* totalmente desmetilado.

6. Discussão

As citocinas são proteínas que regulam uma vasta rede de respostas do corpo humano, tanto no que diz respeito às condições fisiológicas, quanto patológicas, como crescimento, função imune e inflamação. Nos órgãos e tecidos, alterações nos níveis de citocinas exercem papel importante no estabelecimento e progressão de uma patologia, inclusive durante a inflamação. A periodontite é uma doença complexa e multifatorial que resulta da interação entre os mecanismos de defesa do hospedeiro com os microrganismos da placa. Esta interação é capaz de levar às

características clínicas principais da periodontite, como inflamação gengival, perda de inserção clínica, aparecimento de bolsas periodontais e perda óssea alveolar (Flemmig 1999). A periodontite agressiva é uma das formas de periodontite e usualmente afeta jovens saudáveis, promovendo rápida perda de inserção clínica e destruição óssea (Armitage 1999).

Durante o processo inflamatório que acontece no estabelecimento e progressão da periodontite, uma rede complexa de citocinas é ativada na tentativa de restabelecer o equilíbrio do hospedeiro e minimizar os danos teciduais. Uma das vias de sinalização que participa ativamente deste processo, modulando a resposta das citocinas é a via JAK-STAT. Os genes *SOCS* codificam uma família de proteínas intracelulares denominadas proteínas *SOCS*, capazes de regular a força e duração da cascata de sinalização de citocinas (Tan e Rabkin 2005; Babon e Nicola 2012). Até o momento, oito membros desta família foram identificados, *SOCS1* a *7* e *cytokine inducible SH2-domain-containing protein*. Estas proteínas atuam na via de sinalização JAK/STAT e funcionam em um clássico loop de feedback negativo, ou seja, a sinalização da citocina induz as proteínas *SOCS* que por sua vez podem inibir a via de sinalização que estimulou sua própria produção (Davey et al, 2005; Tan e Rabkin 2005; Babon e Nicola, 2012).

Garlet et al. (2006) encontraram níveis elevados de mRNA para as proteínas *SOCS 1*, *-2* e *-3* em tecidos periodontais inflamados, mostrando uma maior transcrição dos respectivos genes e indicando um envolvimento na regulação das citocinas inflamatórias, talvez na tentativa de atenuar a reação inflamatória da periodontite. Achados recentes indicam que a expressão das proteínas *SOCS*, em periodontite induzida por ligadura em ratos, está correlacionada com a reabsorção óssea e o “status” inflamatório da doença (de Souza et al., 2011).

A metilação é uma marca epigenética comum e frequentemente encontrada nas sequências CpGs e, quando localizada na região promotora de um gene, é considerada uma marca repressiva (Laird 2010). Os genes *SOCS*, por possuírem várias ilhas CpGs, seriam candidatos perfeitos à regulação epigenética.

Há pouca informação na literatura sobre os padrões de metilação e a periodontite e, até o presente momento, nenhum estudo envolvendo os genes *SOCS*, periodontite e metilação.

Os resultados do presente estudo apontam para uma desmetilação grande no trecho analisado do gene *SOCS1*. Esta desmetilação está presente tanto no DNA das células coletadas de pacientes com saúde periodontal quanto nas dos pacientes com periodontite agressiva no momento da coleta. No entanto, a desmetilação é menor no grupo de pacientes com periodontite, ou seja, é possível que haja uma maior quantidade de DNAs metilados no trecho analisado, tornando este trecho menos permissivo à transcrição do gene, nos pacientes que apresentam a doença. Talvez este mecanismo possa fazer parte de um controle de transcrição que participa do processo inflamatório, contribuindo para a periodontite. A complexidade da resposta inflamatória requer o desenvolvimento de uma rede regulatória sofisticada capaz de ativar funções a nível de sinais e genes específicos. Esta rede envolve a ativação de genes específicos de defesa antimicrobiana, resposta imune, remodelamento e reparo do tecido (Medzhitov e Horng 2009). Os genes *SOCS* são parte importante na intrincada rede de resposta à inflamação, além de outros inúmeros genes que também possuem papel fundamental.

Alguns outros estudos estão sendo realizados por nosso grupo de pesquisa, com o gene *SOCS1*, além do presente estudo. Embora o material genético dos vários estudos seja coletado de diferentes pacientes e em sítios periodontais distintos, em pacientes apresentando diferentes formas e severidade da doença, sendo os tecidos macerados ou microdissecados ou ainda na forma de bochecho, o interessante é que há uma corroboração e complementação dos resultados, apontando para uma desmetilação neste gene, principalmente na presença de saúde periodontal. Na presença da inflamação, uma frequência de metilação de cerca de 10-15% na região do gene é observada, talvez fazendo parte do controle da transcrição que participa do processo inflamatório, contribuindo para a periodontite.

Um dos estudos foi realizado com tecidos gengivais macerados de pacientes saudáveis e acometido por periodontite crônica. Os resultados mostraram uma porcentagem maior de metilação nos pacientes com inflamação do que nos

pacientes com o periodonto saudável, no gene *SOCS1*. Embora as metodologias tenham sido diferentes (COBRA no presente estudo x MS-HRM no outro estudo citado), os resultados apontam para a mesma direção. Portanto, parece que as células do epitélio bucal, durante a inflamação na periodontite, possuem o mesmo padrão de metilação no gene *SOCS1* encontrado nas células do tecido gengival, próximas ao sítio inflamado, detectando-se a possível propagação das alterações epigenéticas no DNA devido à inflamação não limitada. Esta dedução deve ser feita com cautela, pois os pacientes não são os mesmos em ambos os estudos, porém os resultados apontam para esta direção.

Outro estudo do mesmo grupo comparou os padrões de metilação no gene *SOCS1* entre tecidos periodontais saudáveis e tecidos previamente inflamados cronicamente, porém saudáveis no momento da coleta. A inflamação neste grupo havia sido controlada há 6 meses. Neste estudo utilizou-se a microdissecção do tecido gengival, para avaliação da metilação no epitélio e no conjuntivo separadamente. Descobriu-se que os padrões de metilação no gene *SOCS1*, após 6 meses de controle da inflamação são os mesmos entre os grupos e se apresentam entre 0 – 5% de metilação. Portanto, as células livres de inflamação (ambos os grupos) possuem um perfil de desmetilação muito acentuado para esta região do gene, assemelhando-se aos resultados encontrados no grupo controle do presente estudo, demonstrando a manutenção do padrão de metilação à distância, quando comparados aos resultados *in situ*, obtidos diretamente do tecido periodontal microdissecado. Embora as metodologias tenham sido diferentes (COBRA no presente estudo x MS-HRM no estudo utilizando a microdissecção), os resultados apontam para a mesma direção.

Outro dado interessante foi a detecção de uma frequência maior de pacientes totalmente desmetilados no grupo sem a doença, comparados aos que apresentavam a doença. Estes dados corroboram os resultados encontrados nos outros dois estudos citados anteriormente (macerado e microdissecado), nos quais os DNAs das células dos tecidos sem inflamação periodontal apresentavam altos níveis de desmetilação, sendo que várias amostras apresentavam cerca de 100% de desmetilação, detectadas por MS-HRM.

Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que os pacientes com inflamação periodontal apresentavam maior metilação na região analisada do gene *SOCS1*. Este cenário pode fazer parte de um controle epigenético de transcrição, relacionado a uma possível menor permissividade da transcrição do gene, nos pacientes acometidos pela periodontite agressiva. Quando comparamos os resultados do presente estudo (material genético à distância do sítio periodontal) com outros estudos do mesmo grupo (material genético próximo ao sítio periodontal), observamos uma possível propagação das alterações epigenéticas no DNA devido à inflamação não limitada, para o grupo com periodontite ou a manutenção do padrão de metilação à distância, para o grupo sem inflamação periodontal.

7. Conclusão

Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que os pacientes com inflamação periodontal apresentavam maior metilação na região analisada do gene *SOCS1*. Este cenário pode fazer parte de um controle epigenético de transcrição, relacionado a uma possível menor permissividade da transcrição do gene, nos pacientes acometidos pela periodontite agressiva. Quando comparamos os resultados do presente estudo (material genético à distância do sítio periodontal) com outros estudos do mesmo grupo (material genético próximo ao sítio periodontal), observamos uma possível propagação das alterações epigenéticas no DNA devido à inflamação não limitada, para o grupo com periodontite ou a manutenção do padrão de metilação à distância, para o grupo sem inflamação periodontal.

Referências

1. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*.1975; 25(4): 229-235.
2. Albandar JM, Tinoco EM. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol* 2000. 2002; 29: 153-176.

3. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 503-529.
4. Andia DC, de Oliveira NF, Casarin RC, Casati MZ, Line SR, de Souza AP. DNA methylation status of the IL8 gene promoter in aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2010; 81(9): 1336-1341.
5. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1): 1-6.
6. Babon JJ, Nicola NA. The biology and mechanism of action of suppressor of cytokine signaling 3. *Growth Factors.* 2012; 30(4): 207-219.
7. Barros SP, Offenbacher S. Epigenetics: Connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res.* 2009; 88(5): 400-408.
8. Bayarsaihan, D. Epigenetic mechanisms in inflammation. *J Dent Res.* 2011; 90(1): 9-17.
9. Casarin RC, Peloso Ribeiro ED, Sallum EA, Nociti FH Jr, Gonçalves RB, Casati MZ. The combination of amoxicillin and metronidazole improves clinical and microbiologic results of one-stage, full-mouth, ultrasonic debridement in aggressive periodontitis treatment. *J Periodontol.* 2012; 83(3): 988-998.
10. Cochran DL. Inflammation bone loss in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008; 79(8 Suppl): 1569-1576.
11. Deng G, Chen A, Pong E, Kim Y. S. Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene.* 2001; 20(48): 7120-7127.
12. Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgerit F. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12(5): 218.
13. Davey GM, Heath WR, Starr R. SOCS1: a potent and multifaceted regulator of cytokines and cell-mediated inflammation. *Tissue Antigens.* 2006; 67(1): 1-9.

14. de Souza JA, Nogueira AV, de Souza PP, Cirelli JA, Garlet GP, Rossa C Jr. Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(10): 1120-1128.
15. Eilertsen KJ, Floyd Z, Gimble JM. The epigenetics of adult (somatic) stem cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2008; 18(3): 189-206.
16. Flemmig TF. Periodontitis. *Annals of periodontology.* 1999; 4(1): 32-37.
17. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(2): 143-153.
18. Hartnett L, Egan L J. Inflammation, DNA methylation and colitis-associated cancer. *Carcinogenesis.* 2011; 33(4): 723–731.
19. Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005; 39: 91-117.
20. Laird PW. Principles and challenges of genome wide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet.* 2010; 11(3): 191-203.
21. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13): 3688-3691
22. Menezes R, Garlet TP, Trombone APF, Repeke CE, Letra A, Granjeiro JM, et al. The potential role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis. *J Endod.* 2008; 34(12): 1480–1484.
23. Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(10): 692-703.
24. Mühlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding – a leading symptom in inicial gingivitis. *Helvetica Odontologica Acta.* 1971; 15(2): 107-113.
25. Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature.* 1977; 387(6636): 924-929.

26. Nibali L, Donos N, Brett PM, Parkar M, Ellinas T, Llorente M, et al. A familial analysis of aggressive periodontitis-clinical and genetic findings. *J Periodont Res* 2008; 43(6): 627-634.
27. Oliveira NFP, Damm GR, Andia DC, Salmon C, Nociti FH Jr., Line SRP, et al. DNA methylation status of IL8 gene promoter in oral cells of smokers and nonsmokers with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(9): 719–725.
28. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman K. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology* 2000. 1997; 14: 216-248.
29. Saito H, Morita Y, Fujimoto M, Narazaki M, Naka T, Kishimoto T. IFN regulatory factor-1-mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma. *J Immunol.* 2000; 164(11): 5833-5843.
30. Starr R, Hilton DJ. SOCS: suppressors of cytokine signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30: 1081-1085.
31. Susin C, Albandar JM. Aggressive periodontitis in an urban population in southern Brazil *J Periodontol.* 2005; 76(3): 468-475.
32. Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet.* 2004; 36(5): 497-501.
33. Tam JC, Rabkin R. Suppressors of cytokine signaling in health and disease. *Pediatr Nephrol.* 2005; 20(5): 567-575.
34. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 39-52.
35. Turek-Plewa J, Jagodziński PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett.* 2005;10(4): 631-647.
36. Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science.* 1999; 286: 481-486.

37. Yang X, Lay F, Han H, Jones PA. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. Trends Pharmacol Sci. 2010; 31(11): 536-546.

38. Zhang S, Barros SP, Niculescu MD, Moretti AJ, Preisser JS, Offenbacher S. Alteration of PTGS2 promoter methylation in chronic periodontitis. J Dent Res 2010; 89(2): 133-137.

25/08/13

Comitê de Ética em Pesquisa - Certificado



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS




CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Análise do padrão de metilação do DNA no gene SOCS1 em pacientes com periodontite agressiva**", protocolo nº 130/2011, dos pesquisadores Denise Carleto Andia, Ana Paula de Souza Pardo e Natalia Buzoli Baptista, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 11/11/2011.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Analysis of the DNA methylation status of the SOCS1 gene in aggressive periodontite patients**", register number 130/2011, of Denise Carleto Andia, Ana Paula de Souza Pardo and Natalia Buzoli Baptista, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 11/11/2011.


Prof. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.



VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

Processo	2011/07427-4
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo
Situação	Em Execução
Vigência	01/02/2012 a 31/01/2013
Beneficiário	Natália Buzoli Baptista
Responsável	Denise Carleto Andia
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOOP/UNICAMP
Área de Alocação de Recursos	Saúde

Folha de Despacho

Datas do Despacho

Emitido em / por: 06/09/2013 Walter Fritschi

Objetos de análise

Objeto de análise	Data de Submissão	Resultado
Relatório Científico 2	22/05/2013	Aprovado

Observações / Transcrições / Frases

Observações ao Responsável

Comunicamos que o Relatório Científico relativo ao processo acima referido foi analisado pela assessoria científica da FAPESP.

A transcrição do parecer está sendo enviada exclusivamente ao orientador, sendo de sua responsabilidade compartilhar as partes que considerar relevantes com o bolsista, o qual receberá uma cópia desta mensagem.

Para visualizar o parecer, por favor, acesse o Sistema SAGE (www.fapesp.br/sage), clique no menu Processos/Meus Processos e em Mais Informações/Despachos.

Atenciosamente,

Carlos Henrique de Brito Cruz
Diretor Científico da FAPESP

Frases para o Responsável

Não há frases associadas.

Transcrição de Parecer para o Responsável

Parecer do Relatório Científico

Por favor, emita o parecer, comentários, críticas e sugestões.

O relatório final do estudo Análise do padrão de metilação do DNA no gene SOCS1 em pacientes com periódontite agressiva mostra uma grande dificuldade que os autores tiveram durante o desenvolvimento do projeto. Pela descrição essas dificuldades foram solucionadas, demonstrando uma grande habilidade da orientadora e da aluna em resolver os problemas. O relatório final agora apresenta uma discussão dos resultados com a literatura encontrada. A metodologia muito bem detalhada. Tem uma conclusão e referências. No resumo: O bochecho dos pacientes foi coletado e o DNA extraído, purificado e convertido pelo bissulfato de sódio. Seria melhor se fosse: o DNA dos pacientes foi obtido através de bochecho da solução de..... Na metodologia: Está correto dizer que o grupo controle foi pareado com o teste, não acho que deva incluir o mesmo comentário no grupo teste. Devido a dificuldade encontrada na enzima de restrição sensível à metilação, sugiro que em um próximo projeto seja feito um piloto para prevenir tais inconvenientes. Referência 5 e 6 são iguais, referência 10 apresenta duas referências. De acordo com os resultados encontrado de metilação de 97 e 92% apesar de encontrar diferenças estatísticas, vocês acham que uma amostra maior o resultado seria semelhante? Os gráficos deveriam ser feitos com a mesma porcentagem no eixo y (isto é a figura 8 deveria ter de 0 a 100% que é o mais real).

Avaliação

Etapa cumprida no relatório apresentado

- Ótimo
 Bom
 Regular
 Fraco

Para Relatório FINAL

Em relação à proposta inicial os resultados obtidos estão:

- Acima das expectativas
 Dentro das expectativas
 Aquém das expectativas
 Muito aquém das expectativas

Frases para Termo de Outorga

Não há frases associadas.

Relatório Científico 2 (Aprovado)

Compromisso	15/07/2013
Período Relacionado	10/07/2012 a 31/01/2013
Situação	Atendido