Relação entre a produção de HSP60 por CMSP de indivíduos com periodontite e a extensão da doença.

Thaise Passos Rocha¹; Soraya Castro Trindade², Paulo Cirino de Carvalho Filho³, Ana Carla Montino Pimentel⁴, Márcia Tosta Xavier⁵

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduando Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: thaisepassos@gmail.com

2. Orientadora, Departamento Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: soraya.castrotrindade@gmail.com

3. Co-autor, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, email: pauloccf@yahoo.com

4. Co-autor, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, email: anacpimentel_ba@hotmail.com

5. Co-autor, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, email: tostamarcia@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: HSP60, células mononucleadas do sangue periférico (CMSP), periodontite.

INTRODUÇÃO:

A periodontite crônica (PC) é uma doença inflamatória, que resulta na perda dos tecidos de proteção e sustentação do dente. Dentre os microrganismos responsáveis por sua etiologia destaca-se *Porphyromonas gingivalis*, que possui uma variedade de fatores de virulência, entre eles, fímbrias, LPS, gingipaínas (ARUNI et al., 2011), hemaglutininas (GAO et al, 2010) e HmuY. A lipoproteína HmuY, um sideróforo expresso na superfície da bactéria em ambientes com limitação de ferro (OLCZAK, 2006), apresenta também um potencial imunogênico, induzindo altos níveis de IL-1 β e IL-6 (TRINDADE et al, 2012; TRINDADE et al, 2013). Por outro lado, em resposta a agressões provocadas pelos microrganismos durante a infecção, as células do hospedeiro possuem mecanismos de resistência bastante eficazes, como as proteínas de choque térmico (HSP). Em situação de estresse, elas auxiliam na homeostasia celular e são imunógenos, podendo contribuir com inúmeras doenças de caráter inflamatório.

É possível que a infecção por *Porphyromonas gingivalis* desempenhe um papel na expressão e produção de HSP60, tendo consequência na patogênese da periodontite (PIMENTEL, 2014). Assim, o objetivo do presente estudo é observar a relação da extensão da doença periodontal com a produção de HSP60 por CMSP de indivíduos doentes.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Foram avaliados 13 indivíduos com periodontite crônica que buscaram atendimento no ambulatório da disciplina Estudos Integrados IX, do Curso de Odontologia da UEFS. Os critérios de não inclusão avaliados pela anamnese e considerados a elegibilidade foram: história de doenças sistêmicas, gestação atual, tratamento periodontal anterior, fumo atual ou anterior, uso de antibióticos e anti-inflamatórios, respectivamente, nos seis e dois meses anteriores à coleta.

Após esclarecimento, os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. A avaliação da condição periodontal foi realizada por um único examinador e a presença da doença foi diagnosticada segundo os critérios propostos por (GOMES-FILHO et al, 2007). A extensão da doença foi classificada em localizada (menos de

30% dos sítios acometidos) e generalizada (mais de 30% dos sítios acometidos), de acordo com a Academia Americana de Periodontia (ARMITAGE, 1999).

Para a avaliação da produção de HSP60, células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas por meio da centrifugação com gradiente de densidade e em seguida cultivadas em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) com 1% de antibiótico/antimicótico e 10% de soro fetal bovino por 48h a 37°C, sob atmosfera umidificada e em presença de CO₂. Para cada participante as células foram cultivadas em três poços: o primeiro, sem antígeno, como controle negativo; o segundo com 5 µg/mL da lectina pokweed (PWM), como controle positivo e o terceiro com 2,5 µg/mL da lipoproteína HmuY recombinante (rHmuY). As concentrações de HSP60 produzida nas culturas de células (lisado celular e sobrenadante) foram mensuradas por meio do método ELISA sanduíche, usando-se kits disponíveis comercialmente (R&D Systems, USA).

Análise correlação entre a extensão da doença e os níveis de HSP60 foi efetuada no pacote estatístico SPSS 17.0 utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson. Todas as análises foram efetuadas no, considerando-se significantes os valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Para a execução do presente estudo, foram recrutados 330 indivíduos, porém, em razão das recusas e dos rigorosos critérios de não inclusão, apenas 13 voluntários que tiveram o diagnóstico de periodontite crônica foram incluídos. Dos 13 participantes, 12 apresentaram menos de 30% dos sítios acometidos pela periodontite. Apenas um pôde ser classificado com a forma generalizada, ou seja, com mais de 30% dos sítios afetados.

No presente estudo, pode-se verificar uma tendência de maior produção de HSP60 na medida que a extensão da doença se aproxima dos 30% de sítios acometidos pela doença (Gráfico 1). No entanto, o tamanho da amostra foi pequeno (N=13) e só houve um caso de periodontite generalizada, o que influenciou na perda do poder na análise estatística ($p=0,076$).

Fatores de virulência de *Porphyromonas gingivalis*, como o LPS, podem estimular linhagens de ceratinócitos orais a secretar HSP60, levando à indução da expressão do gene de IL-1 β por meio da ativação da via p44/42 MAP kinase. (PLEGUEZUELOS et al., 2005). HmuY de *P. gingivalis* também é capaz de atuar na resposta imune induzindo a produção de IL-10 e IL-1 β e inibir a produção de IL-8 (TRINDADE et al., 2012a). Sendo assim, a produção de HSP60 também pode desempenhar um papel intermediador entre HmuY e o sistema imune, porém este mecanismo de interação bactéria-hospedeiro precisa ser melhor elucidado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi possível investigar pela primeira vez, a relação entre os níveis de HSP60 humano e a extensão da doença, e mesmo com um número de amostra pequeno, observou-se uma tendência de aumento dos níveis desta proteína estimuladas por HmuY de *Porphyromonas gingivalis* quando a extensão da doença se aproxima aos 30% dos sítios acometidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMITAGE G. The pathogenesis of periodontal diseases. J periodontal, vol. 70, p. 457-470, 1999.
- ARUNI, AW, E. VANTERPOOL, D. OSBOURNE, F. ROY, A. MUTHIAH, Y. DOU HM E FLETCHER. Sialidase e sialoglycoproteases pode modular virulência em *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Imunidade, 79:. 2.779-2.791,2011.
- EKE P.I ,DYE B.A., WEI L., THORNTON-EVANS G.O., AND GENCO R.J.. Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: 2009 and 2010.Agosto,2012.
- GAO J, NGUYEN K & HUNTER N. Characterization of a hemophore-like protein from *Porphyromonas gingivalis*. The JournalofBiologicalChemistry, vol. 285, n. 51, p. 40028-40038, 2010.
- GOMES-FILHO, I. S.; et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity low birth weight. J Periodontol, v. 34, p. 957-963, 2007.
- OLCZAK T, SIUDEJA K, OLCZAK M. Purification and Initial Characterization of a novel *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein expressed in *Escherichia coli* and insect cells. Protein expression and Purification, vol.49, p. 299-306, 2006.
- PLEGUEZUELOS O.; DAINITY S. J.; KAPAS S.; TAYLOR J.J.. A human oral keratinocyte cell line responds to human heat shock protein 60 through activation of ERK1/2 MAP kinases and up-regulation of IL-1B.Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology, 141; 307-314.
- PIMENTEL, ANA CARLA MONTINO. O papel de HmuY de *Porphyromonas gingivalis* na produção de HSP60 por células mononucleares do sangue periférico de portadores de periodontite crônica.Brasil, 18-Dez-2014. (Dissertação de mestrado) Programa de Pós-graduação em Imunologia- Universidade Federal da Bahia.
- TRINDADE, S. C. ; OLCKZAK, T. ; Gomes-Filho, Isaac Suzart ; Moura-Costa, Lília ; CERQUEIRA, E. M. M. ; OLIVEIRA NETO, M. G. ; ALVES, H.; CARVALHO FILHO, P. C. ; Xavier, M.T. ; MEYER, R. . Induction of interleukin (IL)-1 β , IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans.Journal of Periodontal Research, v. 47, p. 27-32, 2012a;
- TRINDADE, S. C. ; OLCKZAC, T. ; GOMES-FILHO, I. S. ; COSTA, L. F. M.; VALE, V. L. C. ; Oliveira-Neto, M G ; Alves, H ; CARVALHO-FILHO, PC ; Sampaio GP ; Xavier, M.T. ; Meyer, R. ; Meyer, R. . *Porphyromonas gingivalis* antigens differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. Archivesof Oral Biology, v. 57, p. 314-320, 2012b;
- TRINDADE, S. C. ; Olczak, Teresa ; Gomes-Filho, Isaac S. ; COSTA, L. F. M. ; VALE, V. L. C. ; Galdino-Neto, Milton ; Alves, Heidiane ; Carvalho-Filho, Paulo Cirino ; Stocker, Andreas ; Bendicho, Maria Teresita ; Xavier, M.T. ;

Cerqueira, Eneida de M. M. ; Meyer, Roberto . Porphyromonas gingivalis HmuY-Induced Production of Interleukin-6 and IL-6 Polymorphism in Chronic Periodontitis. Journal of Periodontology (1970), v. 84, p. 50-55, 2013.