EXPRESSÃO GÊNICA DE FAS EM CMSP DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE PERIODONTITE CRÔNICA.

Santos R A¹; Trindade SC²; Santos RPB³; Pimentel ACM⁴; Xavier MT⁵; Filho PCC⁶

1. Ricardo Almeida dos Santos PIBIC/FAPESB, Graduando em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ricardoalmeida_s@hotmail.com
2. Soraya Castro Trindade, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: soraya@uefs.br
3. Rebeca Pereira Bulhosa Santos, mestranda em imunologia, Universidade Federal da Bahia, e-mail: biorebecabulhosa@gmail.com
4. Ana Carla Montinho Pimentel, doutoranda em imunologia, Universidade Federal da Bahia, e-mail: anacpimentel_ba@hotmail.com
5. Marcia Tosta Xavier, Departamento de bioquímica, Universidade Federal da Bahia, e-mail: tostamarcia@gmail.com
6. Paulo Cirino de Carvalho Filho, Doutor em imunologia, Universidade Federal da Bahia, e-mail: pauloccf@yahoo.com

PALAVRAS-CHAVE: PERIODONTITE CRÔNICA; FAS; APOPTOSE

INTRODUÇÃO

O conhecimento atual sobre a patogênese da Periodontite sugere que ela decorra de interações complexas entre a ação de microorganismos subgingivais e a resposta imunológica do hospedeiro. [GREENSTEIN G 2000] [O'BEIRNE G, 1996]. Componentes de *Porphyromonas gingivalis* modulam a resposta imune do hospedeiro por meio de indução de apoptose de linfócitos T e macrófagos. [LINDHE, J. 1999].

A apoptose associada com a destruição celular é um fenômeno presente nos sítios de inflamação crônica bacteriana na gengiva humana e é de grande importância na regulação da inflamação nas mucosas. [TONETTI, M.S, 1998]. Uma das principais proteínas pró-apoptóticas é o Fas. A proteína Fas pertence à superfamília do receptor do TNF. O gene da proteína Fas (APO1 / CD95), localizado no braço longo do cromossomo 10, na região 2.3 (10q2.3), transcreve um receptor transmembrânico composto de 319 aminoácidos e peso molecular de 40KDa a 50KDa o qual, após sua ligação com o Fas ligante, induz apoptose por meio de seu domínio citoplasmático. [LICHTER, P , 1992] [JU, S.T et al ,1995].

Diante disso pretende-se observar a expressão gênica de FAS em CMSP cultivadas sob estímulo de *Porphyromonas gingivalis* na periodontite crônica.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

Foi proposto um estudo experimental com pessoas com idades acima de 18 anos e de ambos os sexos, que buscaram voluntariamente os ambulatórios do curso de Odontologia da Universidade Estadual de Feira de Santana.

O sangue dos indivíduos foi coletado num volume de 20mL, por punção venosa na fossa ante-cubital com tubo à vácuo estéril (BD-SP) com heparina e submetido a centrifugação por gradiente de densidade. Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram cultivadas em placas de 24 poços por 48h a 37°, em estufa de CO₂, sob o estímulo da proteína HmuY de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277. Depois da avaliação da qualidade e quantidade de RNA o próximo passo foi a análise das amostras por meio da técnica de microarray.

Foi realizada uma análise descritiva dos dados relativos a gênero, idade e descritores clínicos visando a caracterização da amostra. Em seguida, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney e t bicaudal para a comparação dos dados entre os grupos.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Foram incluídos apenas 16 indivíduos, 8 com periodontite crônica grave (PC) e 8 sem periodontite (SP). A média de idade dos participantes do grupo PC foi de 43.88 ±13,9 anos, enquanto a média de idade dos participantes do grupo SP foi de 36.63 ±10.8 anos. Cada grupo foi composto de dois homens e seis mulheres. Não houve diferença estatisticamente significativa na média da idade ($p=0,22$), na proporção de indivíduos do sexo masculino e feminino ($p=1,00$) e na quantidade de dentes presentes na boca ($p=0,98$) entre os dois grupos, demonstrando que ambos foram homogêneos no que diz respeito a estas covariáveis (Tabela 1). Em contrapartida, como esperado, houve diferença nos descritores clínicos periodontais, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1: Achados clínicos dos grupos sem periodontite (SP) e com periodontite crônica grave (PC).

	SP	PC	P
Número de homens/mulheres	2/6	2/6	1.000
Idade (anos) (média ± DP)	36.63 ±10.8	43.88 ±13,9	0.223
Número de dentes presentes na boca (média ± DP)	20.13 ±6.2	20.31 ±6.5	0.983
% SS (média ± DP)	8.78 ±11.49	46.23 ±14.43	0.001
% PS ≥ 4 (média ± DP)	1.01 ±1.55	16.33 ±11.44	0.000

% NIC ≥ 3 (média $\pm$ DP)	20.40 $\pm$ 14.03	61.87 $\pm$ 17.34	0.001
% NIC ≥ 5 (média $\pm$ DP)	0.45 $\pm$ 1.27	23.26 $\pm$ 16.72	0.000

DP Desvio Padrão, SS Sangramento a Sondagem, PS Profundidade de Sondagem, NIC nível de Inserção Clínica.

PADRÃO DE EXPRESSÃO DE mRNA - “HEAT MAP”

Foram identificadas diferenças no padrão de expressão gênica global entre as amostras de PC e SP, especialmente nas amostras de CMSP nos grupos PC e SP estimulados com rHmuY (Figura 1).

Figura 1: - Perfil de Expressão de mRNA - “Heat Map”. Identificação de clusters gênicos envolvidos em mecanismos de apoptose, proteínas de choque térmico, citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição por CMSP de pacientes com periodontite crônica (PC) e sem (SP) sob estímulo de rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* e na ausência de estímulos. O gradiente de cor verde-preto-vermelho representa níveis relativos de expressão gênica, indicando “UnderEven-Over” regulação, respectivamente. Em destaque, a expressão gênica de IL-1 β nas células dos indivíduos de ambos os grupos, com e sem estímulo.

As células dos indivíduos do grupo PC apresentaram menor expressão relativa de FAS do que as células do grupo SP, quando cultivadas com a proteína rHmuY, com uma tendência à significância estatística ($0.05 < \text{§p} < 0.1$), como pode ser observado na figura 2. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para a expressão de FAS por células não estimuladas (Figura 3).

Figura 2: Expressão de mRNA para o gene relacionado ao Receptor da superfamília TNF, Membro 6 (FAS) por células mononucleares do sangue periférico cultivadas em presença de rHmuY. SP: Sem Periodontite; PC: Periodontite crônica. § $p < 0.1$.

Figura 2: Expressão de mRNA para o gene relacionado ao Receptor da superfamília TNF, Membro 6 (FAS) por células mononucleares do sangue periférico cultivadas sem estímulo antigênico. SP: Sem Periodontite; PC: Periodontite crônica.

Os resultados do presente estudo demonstraram a capacidade HmuY de *Porphyromonas gingivalis* atuar na expressão de mRNA para genes que participam da sinalização

molecular de apoptose. Assim, é possível que este fator de virulência do patógeno possa aumentar a sobrevivência de células inflamatórias por inibição de apoptose, mantendo desta forma um estado crônico de inflamação tecidual.

CONCLUSÃO

A proteína recombinante HmuY de *P. gingivalis* diminui a expressão gênica relativa para FAS em CMSP de indivíduos do grupo PC.

REFERÊNCIAS

GREENSTEIN G. Nonsurgical periodontal therapy in 2000: a literature review. *J Am Dental Assoc*, 2000;131:1580-92.

O'BEIRNE G, JOHNSON RH, PERSSON GR, SPEKTOR MD. Efficacy of sonic toothbrush on inflammation and probing depth in adult periodontitis. *J Periodontol*, 1996;67:900-08.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**, GuanabaraKoogan, 1999.

TONETTI, M.S.; CORTELLINI, D.; LANG, N.P. *In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. Infection and Immunity*, v.66, p.5190-5195, 1998.

LICHTER, P.; WALCZAK, H.Ç.; WITZ, S.; BERHMANN, I.; KRAMMER, P.H. *The human APO-1 antigen maps to 10q23, a region which is sythenic with mouse chromossome. Genomics*. v.14, p.179-80, 1992.

JU, S.T.; PANKA, D.J.; CUI, H.E.R.; EL-KHATIB, M.; SHER, D.H.; STANGER, B.Z.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*. v.373, p.444-448, 1995.