

# **Comparação entre os antígenos do extrato sonicado de *Porphyromonas gingivalis* ATCC3277 e a proteína recombinante HmuY na indução da produção de HSP60 por CMSP de indivíduos com periodontite.**

**Larissa Souza Costa<sup>1</sup>; Soraya Castro Trindade<sup>2</sup>; Ana Carla Montino Pimentel<sup>3</sup> e Thaise Passos Rocha<sup>4</sup>.**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [larissasouzacost@gmail.com](mailto:larissasouzacost@gmail.com)
2. Orientador, Departamento de saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [soraya@uefs.br](mailto:soraya@uefs.br)
3. Participante do projeto ou núcleo, Departamento de saúde, Universidade Federal da Bahia, e-mail: [anacpimentel\\_ba@hotmail.com](mailto:anacpimentel_ba@hotmail.com)
4. Participante do projeto ou núcleo, Departamento de saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [thaisepassos@gmail.com](mailto:thaisepassos@gmail.com)

Palavras chave: HSP60, Periodontite, *Porphyromonas gingivalis*.

## **INTRODUÇÃO**

As doenças periodontais, são doenças infecciosas geradoras de condições inflamatórias, que resultam na destruição dos tecidos de sustentação dos dentes (osso, ligamento periodontal e cimento). Esse processo ocorre em decorrência do desequilíbrio entre bactérias e fatores do hospedeiro, resultado de alterações disbióticas que ocorrem no biofilme subgingival (HAJJISHENGALIS e LAMONT, 2014). Muitos estudos apontam para um papel patogênico de *Porphyromonas gingivalis*, colonizador secundário da cavidade oral, cuja presença requer a criação de condições ambientais por microrganismos antecedentes. É considerado um patógeno-chave na disbiose periodontal (HAJJISHENGALIS, 2014), produzindo uma ampla gama de potentes fatores de virulência envolvidos na colonização e destruição tecidual, bem como na modulação da resposta do hospedeiro (ARUNI *et al.*, 2011). Dentre os fatores de virulência destaca-se ainda a lipoproteína HmuY, uma proteína captadora de ferro que induz o aumento nos níveis de IL-10, iL-6, IgG e IgG1 anti-HmuY e inibe a produção de IL-8 por células do sistema imune do hospedeiro (TRINDADE *et al.*, 2012; TRINDADE *et al.*, 2013).

Em resposta as agressões provocadas pelos microrganismos durante a infecção, é sabido que as células possuem mecanismos de proteção bastante eficazes, como as proteínas de choque térmico (HSP). O estresse celular induzido por uma gama de condições, tais como, exposição a altas temperaturas, estresse radioativo, irradiação ultravioleta e infecção viral (POCLEY *et al.*, 1999), assim como por perturbações orgânicas incluindo hipóxia, processos inflamatórios, exposição a toxinas e danos ao DNA, geram diretamente nestas células uma resposta na tentativa de preservar sua homeostasia auxiliadas pelas proteínas de choque térmico.

Recentes estudos têm mostrado evidências que as HSP, especialmente HSP60, possuem propriedades que permitem seu uso na geração de respostas imune específicas contra câncer e agentes infecciosos (PARSELL & LINDQUIST, 1993; LI, *et al.*, 2002; SEGAL *et al.*, 2006; CAPELLO *et al.*, 2008; JEGO *et al.* 2013).

Assim, o objetivo do presente estudo é comparar os níveis de HSP60 em culturas de CMSP estimuladas com o extrato sonicado e com a proteína HmuY de *Porphyromonas gingivalis*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados indivíduos que buscaram atendimento na clínica odontológica da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Os critérios de exclusão avaliados pela anamnese e considerados para este estudo foram: história de doenças sistêmicas, gestação atual, tratamento periodontal anterior, fumo atual ou anterior, uso de antibióticos e antiinflamatórios, respectivamente, nos seis e dois meses anteriores à coleta. Foram preenchidos formulários para obtenção e assinatura do termo de consentimento informado, permanecendo uma cópia com os mesmos. A avaliação da condição periodontal foi realizada por um único examinador devidamente calibrado utilizando como referência os descritores clínicos periodontais propostos por GOMES-FILHO *et al.* (2007).

Para a indução da produção de Hsp60 a proteína recombinante HmuY de *Porphyromonas gingivalis* A7436, de 23kDa, foi construída e purificada utilizando-se *Escherichia coli* para a sua expressão no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Biotecnologia da Universidade de Wrocław, Polônia. A sua pureza foi confirmada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes em presença de sodiumdodecilsulfato (SDS-PAGE) e western blotting. O sangue dos indivíduos foi coletado num volume de 20mL, por punção venosa na fossa antecubital com tubo a vácuo estéril e então diluído em Tampão fosfato-salino (PBS) e submetido a centrifugação.

As CMSP foram então distribuídas em placas para cultivo celular em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) com 1% de antibiótico/antimicrobiano e 10% de soro fetal bovino. Para cada participante as células foram cultivadas em três poços: o primeiro com 2,5 pg/ml de rHmuY e o segundo com 5pg/ml de PWM. Um dos poços para cada paciente permaneceu sem antígeno, como controle negativo. O cultivo foi realizado a 37°C, sob atmosfera umidificada e em presença de CO<sub>2</sub>. Após 48 horas as amostras foram coletadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após convite e entrevista com aproximadamente 600 indivíduos, foram selecionados 27 indivíduos para participar do estudo, em razão das recusas e, principalmente, dos critérios de elegibilidade adotados. Os participantes foram divididos em dois grupos: com periodontite crônica (**PC**), composto por 11 indivíduos (40,7%) e sem periodontite (**SP**), composto por 16 participantes (59,3%). A média ( $\pm$ desvio padrão) de idade dos participantes do grupo **PC** foi de 39,8 anos  $\pm$  7,5 anos e a média ( $\pm$ desvio padrão) de idade dos participantes do grupo **SP** foi de 38 anos  $\pm$  11,5. Dentre os participantes do grupo **CP**, 63,6% (n=7) eram do sexo feminino e 36,4% (n=4) eram do sexo masculino. Já no grupo **SP**, 9 (56,3%) eram do sexo feminino e 7 (43,7%) do sexo masculino. Os grupos de estudos mostraram homogeneidade quanto às variáveis idade e sexo, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa na média da idade (p=0,650) e na proporção de indivíduos do sexo masculino ou feminino (p=0,701) entre os dois grupos.

No entanto, a produção de HSP60 por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) não diferiu entre os grupos (SP e PC), independentemente da condição de estimulação empregada no cultivo: sem estímulo (p=0,090), em presença do mitógeno *Pokeweed* (PWM) (p=0,762) e em presença da proteína rHmuY (p=0,261). Diante destes resultados preliminares os grupos foram unificados, para a análise das possíveis diferenças entre as três formas de cultivo.

Analisando-se, então a produção de HSP60 por CMSP humanas cultivadas sem estímulo, em presença de PWM e em presença de rHmuY, foi possível observar que as células cultivadas com rHmuY produziram as menores concentrações da chaperona, seguidas daquelas cultivadas sem antígeno/mitógeno e, por fim, pelas cultivadas com PWM.

O aumento na produção de HSP60 nas células cultivadas com mitógeno foi anteriormente relatada por Pockley et al., 1999. Sabe-se que a lectina *Pokeweed* utilizada neste experimento é um ativador policlonal de linfócitos (SHAROM, 2007), que induz a proliferação celular. Por outro lado, a proteína rHmuY parece inibir a produção de HSP60. Isto pode ser devido à sua capacidade de inibir a proliferação de CMSP e induzir a morte celular por apoptose tardia e necrose (TRINDADE et al., 2012).

Entretanto, foram observadas diferenças estatisticamente significantes apenas entre as células cultivadas com PWM e as cultivadas com rHmuY ( $p=0,03$ ). Não foram observadas diferenças nos níveis de HSP60 entre as células cultivadas com o PWM e as células cultivadas sem antígeno/mitógeno nem entre estas e as células cultivadas com rHmuY. A impossibilidade de detecção de diferença estatisticamente significativa nas comparações com as células cultivadas sem estímulo, que apresentaram valores intermediários na concentração de HSP60, pode ser devida ao tamanho da amostra, que, apesar da junção dos grupos SP e PC, pode ter sido ainda insuficiente para um bom poder da análise.

Vale salientar, ainda, que as interações moleculares ocorrem preferencialmente de forma parácrina (GEMMELL et al., 2002), na tentativa de conter a infecção no ambiente periodontal. Isto se confirma na boa saúde sistêmica dos indivíduos portadores de periodontite, apesar da fonte crônica de infecção. Assim, os efeitos desta infecção podem não ter sido pronunciados nas células do sangue periférico. Outras abordagens utilizando fluido gengival e saliva se tornam difíceis, já que a HSP60 é uma proteína intracelular e a obtenção de amostras com células se torna condição essencial para a sua avaliação. Por questões éticas, a biópsia de tecidos gengivais também se torna uma estratégia pouco acessível, em razão das indicações muito precisas para este tipo de procedimento.

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 $\beta$  por meio da ativação da via p44/42 MAP kinase. (PLEGUEZUELOS et al., 2005), dessa maneira, observa-se a importância dessa proteína do choque térmico para o sistema imune agindo também estimuladora outras citocinas.

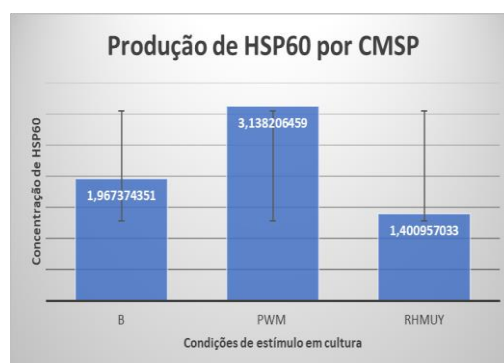


Figura 1: concentração de HSP60 produzida por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) cultivadas sem estímulo de antígeno ou mitógeno (B), sob estímulo do mitógeno *Pokeweed* (PWM) e sob estímulo do antígeno de *Porphyromonas gingivalis*, a lipoproteína recombinante HmuY (rHmuY).

## CONCLUSÃO

HmuY *in vitro* reduz a produção de HSP60 por células mononucleares do sangue periférico.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- CAPELLO F et al. HSP60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. Cancer Biology & Therapy, vol.7, n.6, p. 801-809, 2008.
- GEMELL E, YAMAZAKI K & SEYMOUR GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocyte response. Crit. Rev. Oral Biol. Med. vol.13, p.17-34, 2002.
- HAJISHENGALLIS GEORGE & LAMONT RICHARD J. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. Eur. J. Immunol. 44: 328-338,2014.
- TRINDADE, S. C.; OLCKZAK, T.; GOMES-FILHO, I.S; Moura-Costa, Liba ; CERQUEIRA, E. M. M.; OLIVEIRA NETO, M. G.; ALVES, H.; CARVALHO FILHO, P. C. ; Xavier, M.T. ; MEYER, R. Induction of interleukin (IL)-1p, 1L-10, 1L-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans.Journal of Periodontal Research, v. 47, p. 27-32, 2012a;
- 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.
- PARSELL & LINDQUIST. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annu Rev. Genet., vol. 27, p. 437-496, 1993.
- PLEGUEZUELOS O.; DAINTY 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