



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

TÍTULO DO RESUMO

Isis Carolina de Oliveira Cordeiro¹; Soraya Castro Trindade²; Roberto Meyer Nascimento³ e Paulo Cirino de Carvalho Filho⁴

1. Isis Carolina de Oliveira Cordeiro, Graduando em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: isiscarolinaoc@gmail.com
2. Soraya Castro Trindade, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: soraya@uefs.br
3. Professor de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, e-mail: rmeyer@ufba.br
4. Professor do curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, e-mail: pauloccf@yahoo.com

PALAVRAS-CHAVE: Periodontite Crônica, Casp-7, Apoptose

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória de etiologia multifatorial, caracterizada por destruição do ligamento periodontal, reabsorção óssea e aprofundamento das bolsas periodontais, que em conjunto com a gengivite, pertence a um grupo mais amplo de doenças denominadas "doenças periodontais" (CATON et al, 2018). Microrganismos presentes no biofilme subgengival estão envolvidos no início e progressão da periodontite, e *Porphyromonas gingivalis*, uma bactéria anaeróbia Gram negativa, parece exercer uma grande influência na comunidade microbiana, sendo considerado patógeno-chave na disbiose periodontal (HAJISHENGALLIS e LAMONT, 2014). Componentes de *Porphyromonas gingivalis* modulam a resposta imune do hospedeiro por meio de indução de apoptose de linfócitos T e macrófagos (LINDHE, 2010). Um dos mecanismos utilizados pelas mitocôndrias para induzir a morte celular é a liberação de proteínas pró-apoptóticas no citosol. Assim, esse patógeno patógeno-chave da disbiose, pode estar envolvido nos mecanismos de apoptose, que inclui a expressão de caspase 7 (CASP7). Uma proteína secretada por *Porphyromonas gingivalis* para captação de hemina, denominada HmuY, foi relacionada à regulação de mecanismos de apoptose (TRINDADE et al., 2012), com destaque para a indução no aumento de expressão de BCL-2 CARVALHO-FILHO et al., 2013), uma família de proteínas que pode regular tanto a via intrínseca quanto a via extrínseca de apoptose. Isso demonstra a importância da interação patógeno-hospedeiro por meio da inibição da morte celular programada, na manutenção da inflamação dos tecidos periodontais. Logo, o objetivo deste estudo foi analisar a expressão gênica de caspase 7 (CASP7), uma cisteína protease envolvida nas vias extrínseca e intrínseca, em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) humanas, cultivadas sob estímulo de *Porphyromonas gingivalis*.

MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi realizado com voluntários atendidos nas atividades práticas da disciplina Estudos Integrados IX, do curso de Odontologia da UEFS. Os critérios de elegibilidade foram: ter a partir de 18 anos de idade, não apresentar diabetes, hipertensão, doença autoimune, gestação e hábito de fumar, além de não ter feito uso de medicação antibiótica e antiinflamatória há pelo menos seis e dois meses antes da coleta, respectivamente. A presença de periodontite foi determinada quando o indivíduo possuísse 4 ou mais dentes com um ou mais sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 4 mm, com perda de inserção clínica maior ou igual a 3 mm no mesmo sítio e presença de sangramento à sondagem (GOMES-FILHO et al., 2007). O indivíduo classificado com periodontite ainda teria que atender aos critérios de gravidade, para ser considerado com periodontite grave: pelo menos dois sítios inerproximais com perda de inserção clínica maior ou igual a 6mm (não afetando o mesmo dente) e no mínimo um sítio interproximal com profundidade de sondagem maior ou igual a 5mm (PAGE & EKE, 2007). As CMSP foram cultivadas *in vitro* sem estimulação antigênica ou sob estímulo de HmuY recombinante (rHmuY) por 48 horas. Reações em cadeia da polimerase quantitativas (qPCR), customizadas para avaliar a expressão de mRNA de genes de CASP7, foram realizadas para cada amostra de cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

Foi realizada a avaliação de 46 voluntários para participação no estudo. Entretanto após a verificação dos critérios de elegibilidade e dos critérios de presença e gravidade da periodontite, foram selecionados 16 participantes, oito com periodontite grave (PG) e oito sem periodontite (SP). Os dois grupos se mostraram homogêneos quanto ao sexo e à idade, não havendo diferença estatisticamente significativa nestas covariáveis ($p=0,96$ e $p=0,57$, respectivamente), como pode ser observado na tabela 1.

Quanto aos descritores clínicos periodontais, como já esperado, o grupo P apresentou as piores condições (Tabela 1), com um percentual mais alto de sangramento à sondagem ($p=0,03$), de sítios com profundidade de sondagem ≥ 4 mm ($p = 0,001$) e de sítios com nível de inserção clínica ≥ 3 mm ($p = 0,001$). Vale destacar que o emprego de um critério robusto para a classificação da periodontite (GOMES-FILHO et al., 2018), embora tenha afetado o tamanho da amostra, garantiu que os indivíduos com o diagnóstico da doença não provinham de resultados falso-positivos.

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

	Sem periodontite (SP)	Com periodontite (PG)	P*
Percentual de homens/mulheres	34,62%/65,38	35%/65%	0,958
Idade (média \pm desvio padrão)	37,92 \pm 10,8	41,95 \pm 9,7	0,565
Percentual de sítios com sangramento à sondagem (média \pm desvio padrão)	8,45 \pm 10,7	37,97 \pm 16,9	0,028
Percentual de sítios com profundidade de sondagem ≥ 4 mm (média \pm desvio padrão)	1,23 \pm 1,84	14,93 \pm 8,91	0,001
Percentual de sítios com nível de inserção clínica ≥ 3 mm (média \pm desvio padrão)	19,60 \pm 15,53	57,04 \pm 17,25	0,001

*p = nível de significância ($p \leq 0,05$).

Quanto à expressão gênica de CASP7, o grupo sem periodontite apresentou um padrão de regulação positiva, enquanto o grupo com periodontite demonstrou um padrão de regulação negativa, tanto para as células cultivadas com estímulo quanto as células estimuladas com a proteína recombinante HmuY (Figura 1). Entretanto, só foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando as células foram cultivadas sem estimulação antigênica (Figura 2).

Estes resultados indicam diferenças na expressão de mRNA referentes aos alvos que participam da sinalização molecular de apoptose na via intrínseca por CMSP. Embora a diferença entre os grupos só tenha sido observada nas células cultivadas sem estímulo, ou seja, sem o desafio antigênico, o contato prévio *in vivo* dos indivíduos doentes com bactérias patogênicas pode ter influenciado a regulação da expressão gênica de CASP-7 *in vitro*.

Entretanto, os resultados devem ser interpretados com parcimônia, por não representarem o microambiente da bolsa periodontal, onde ocorrem as interações patógeno-hospedeiro, com a participação crucial das células residentes (CARVALHO-FILHO et al., 2019).

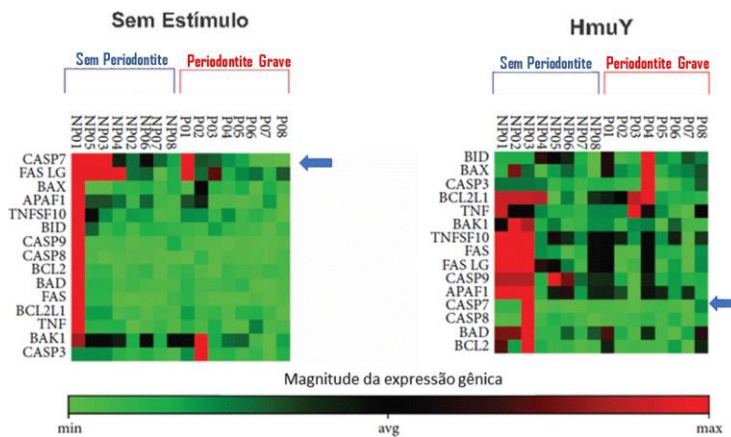


Figura 1 - Perfil de Expressão de mRNA - "Heat Map". Identificação de *clusters* gênicos envolvidos em mecanismos de apoptose em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com periodontite grave (PG) e sem periodontite (SP), cultivadas sem estimulação, ou sob estímulo de rHmuY de *Porphyromonas gingivalis*. O gradiente de cor verde-preto-vermelho representa níveis relativos de expressão gênica, indicando "Under-Even-Over" regulação, respectivamente.

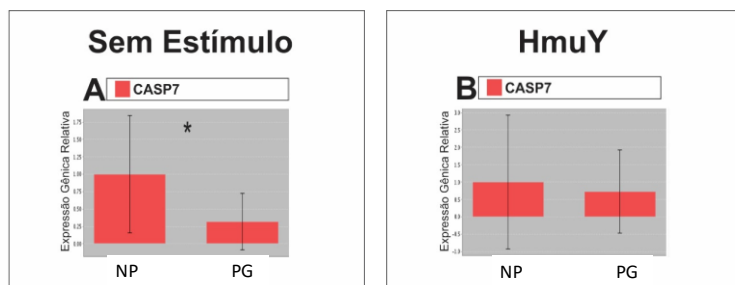


Figura 2: Expressão de mRNA para gene relacionado à caspase 7 (CASP7) em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos sem periodontite SP e com periodontite (P) cultivadas sem estímulo antigênico (A) ou cultivadas em presença de HmuY (B). *p=0,0499.

A participação da via intrínseca na patogênese da periodontite ainda é pouco estudada em relação à via intrínseca. Além disso, a maioria dos estudos envolvem moléculas antiapoptóticas, tais como Bcl-2, Bcl-xL e Bcl-6 (CARVALHO-FILHO et al., 2013; WANG et al., 2015; LAKSCHEVITZ et al., 2013; SEMLALI et al., 2011). Sendo

assim, o presente estudo contribui com um dado relevante para a compreensão da regulação da apoptose no contexto da periodontite.

CONCLUSÃO

A expressão do gene da proteína pró-apoptótica da via intrínseca caspase 7 é regulada negativamente na periodontite.

REFERÊNCIAS

- Caton GJ, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20):S1-8
- Carvalho-Filho PC, Trindade SC, Olczak T, Sampaio GP, Oliveira-Neto MG, Santos HA, Pereira BF, Moura-Costa L, Xavier MT, Meyer R. *Porphyromonas gingivalis* HmuY stimulates expression of Bcl-2 and Fas by human CD3+ T cells. **BMC Microbiology** 2013; 13:206.
- CARVALHO-FILHO, Paulo C. e colab. Apoptosis Transcriptional Profile Induced by *Porphyromonas gingivalis* HmuY. *Mediators of Inflammation*, v. 2019, p. 1–8, 18 Mar 2019. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2019/6758159/>>.
- Gomes-Filho IS, Cruz SS, Rezende EJ, Dos Santos CA, Soledade KR, Magalhaes MA, et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. **Journal of Clinical Periodontology**. 2007;34(11):957-63.
- GOMES-FILHO, Isaac Suzart; TRINDADE, Soraya Castro; PASSOS-SOARES, Johelle de Santana; et al. Clinical diagnosis criteria for periodontal disease: an update. *Journal of Dental Health Oral Disorders & Therapy*. v. 9, n. 5, p. 354–356, setembro/2018
- HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Trends in Immunology*, v.44, p. 328-338, 2014.
- LAKSCHEVITZ, F.S.; ABOODI, G.M.; GLOGAUER, M. Oral neutrophil transcriptome changes result in a pro-survival phenotype in periodontal diseases. *PLoS One*. v.8, p.e68983, 2013.
- Lindhe J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**, 5ª. Ed. Guanabara Koogan, 2010.)
- SEMLALI A, CHAKIR J, GOULET JP, CHMIELEWSKI W, ROUABHIA M. Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. *J Periodontal Res* 2011; 46:533-541.
- R. C. Page and P. I. Eke, “Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis,” *Journal of Periodontology*, vol. 78, no. 7s, pp. 1387–1399, 2007
- Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, et al: *Porphyromonas gingivalis* antigens 8 differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. **Archives of Oral Biology** 2012; 57:314–320.
- Wang Y., Wang R., Wang Y., Peng R., Wu Y., Yuan Y. (2015). Ginkgo biloba extract mitigates liver fibrosis and apoptosis by regulating p38 MAPK, NF-κB/IκBα, and Bcl-2/Bax signaling. *Drug Des. Devel. Ther.* 9, 6303–6317.