

Expressão gênica de CASP-9 em CMSP de indivíduos portadores de periodontite crônica.

Larissa Souza Costa¹; Soraya Castro Trindade²; Isaac Suzart Gomes Filho³, Paulo Cirino de Carvalho Filho⁴

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: larissasouzacost@gmail.com
2. Orientador, Departamento de saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: soraya@uefs.br.
3. Professor do curso de Odontologia da Uefs, Departamento de saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil, e-mail: isuzart@gmail.com.
4. Participante do projeto, Departamento de saúde, Universidade Federal da Bahia, e-mail: paulofilho@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Periodontite, Crônica, Casp-9, Apoptose

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória resultante de uma complexa interação entre microrganismos colonizadores do biofilme subgingival e a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro. É caracterizada por alterações histopatológicas irreversíveis, como destruição do ligamento periodontal, destruição óssea e aprofundamento das bolsas periodontais, que podem convergir para a perda dentária (CHAPPLE, 1996; KINANE, 2017).

Porphyromonas gingivalis, considerada patógeno-chave na disbiose periodontal (HAJISHENGALLIS, 2014), pode induzir a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro, levando à produção de citocinas e inibindo a apoptose. Um dos mecanismos utilizado pela bactéria está relacionado à produção de HmuY, uma proteína cuja função primária é a captação de ferro, mas que se comporta também como um importante imunógeno (TRINDADE et al., 2012; TRINDADE et al, 2013; CARVALHO-FILHO et al., 2013).

Dentre as proteínas relacionadas à apoptose as caspases se destacam por estarem envolvidas em diversas vias deste tipo de morte celular. São uma classe de cisteína proteases ativadas através de uma cascata proteolítica, cujas iniciadoras são a caspase-8 (CASP8) e a caspase-9 (CASP9).

A CASP9 é uma iniciadora da via intrínseca de apoptose, que pode ser desencadeada por estímulos apoptóticos intrínsecos, tais como danos ao DNA ou estímulos estressores ao retículo endoplasmático. Estes estímulos desencadeiam uma série de eventos que levam à formação de uma estrutura denominada apoptossomo, que recruta e ativa CASP9. Com esta ativação, a CASP9 ativa as capazes executoras em uma cascata de zimógenos que culmina na morte celular (STEPHEN, 2010).

Diante da necessidade de melhor compreender a interação patógeno-hospedeiro na periodontite via HmuY de *Porphyromonas gingivalis* e apoptose, o presente estudo buscou avaliar a expressão gênica de CASP-9 em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) humanas, em indivíduos com e sem periodontite.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo experimental foi realizado com participantes com idades acima de 18 anos e de ambos os sexos, que buscaram voluntariamente a Clínica Odontológica Joildo Guimarães, do curso de Odontologia da Universidade Estadual de Feira de Santana. Os seguintes critérios de elegibilidade foram avaliados pela anamnese: idade maior ou igual a 18 anos, ausência de

diabetes, hipertensão, doenças auto-imunes, doenças reumáticas, gestação atual, tratamento periodontal anterior, tabagismo atual ou anterior, uso de antibióticos e anti-inflamatórios, respectivamente, nos três e um mês anteriores à coleta. Foram preenchidos formulários para obtenção e assinatura do termo de consentimento informado, permanecendo uma cópia com os mesmos.

O diagnóstico de presença ou ausência de periodontite foi feito com base nos critérios propostos por GOMES-FILHO *et al.* (2007). Todos os indivíduos com periodontite também se encaixavam nos critérios de periodontite grave, apresentando pelo menos dois sítios interproximais 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).

Após a coleta de sangue dos participantes, as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas por centrifugação em gradiente de densidade. A integridade da membrana celular foi determinada por exclusão com azul de Tripán. As CMSP foram cultivadas em placas de 24 poços por 48h a 37°, em estufa de CO₂, sob o estímulo da proteína recombinante HmuY de *P. gingivalis* A7436. Um poço com células sem estímulo foi mantido na cultura para a análise da expressão basal de CASP-9 pelas células.

O RNA total foi extraído de todas as amostras da cultura de CMSP com o RNeasy Mini Kit da QIAGEN (número de catálogo: 74104) e depois convertido em DNA complementar (cDNA). Em seguida, para a análise da expressão gênica foi utilizado um sistema de PCR em tempo real (ABI QuantStudio 384-well block) com um arranjo que permitiu a análise simultânea de 42 genes envolvidos em mecanismos de apoptose (incluindo CASP9), reposta de células T, inflamação e receptores celulares, além dos controles endógenos.

A análise dos dados foi feita utilizando um programa online disponibilizado pelo fabricante (RT₂ Profiler PCR Array Data Analysis - SABiosciences). O programa realizou todos os cálculos de diferença de expressão baseado no AACt. Comparações dos valores de expressões gênicas aumentadas foram consideradas significantes com $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram convidados a participar do estudo 46 indivíduos. Após a verificação dos critérios de elegibilidade e do exame periodontal, permaneceram 16 indivíduos, oito com periodontite (CP) e oito sem periodontite (SP). A média de idade dos participantes do grupo CP foi de 41,95 anos \pm 9,7 anos e do grupo SP foi de 37,92 anos \pm 10,8 anos. Com relação ao sexo dos voluntários, entre os participantes do grupo CP, 65% eram do sexo feminino e 35% eram do sexo masculino. Já no grupo SP, 65,4% eram do sexo feminino e 34,6% do sexo masculino. Não houve diferença estatisticamente significativa na média da idade ($p=0,565$) e na proporção de indivíduos do sexo masculino ou feminino ($p=0,958$) entre os dois grupos, demonstrando que ambos foram homogêneos no que diz respeito a estas duas co-variáveis.

Quanto à expressão de mRNA para o gene da caspase9 (CASP9), proteína relacionada à via intrínseca da apoptose, foi observada uma regulação negativa, estatisticamente significativa, no grupo CP em comparação com o grupo referência SP, quando as células foram cultivadas com a proteína recombinante HmuY ($p=0,0027$), como pode ser observado no gráfico 1. Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando as células foram cultivadas sem estimulação antigênica (Gráfico 2).

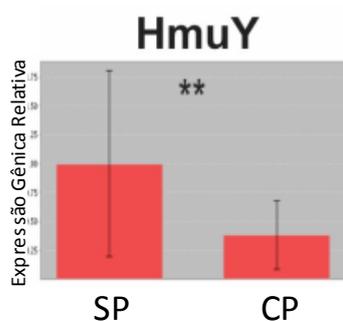


Gráfico 1: Expressão de mRNA de caspase 9 (CASP9) em células de indivíduos sem periodontite (SP) e com periodontite (CP) cultivadas com a proteína recombinante HmuY de *Porphyromonas gingivalis*. ** $p=0,0027$.

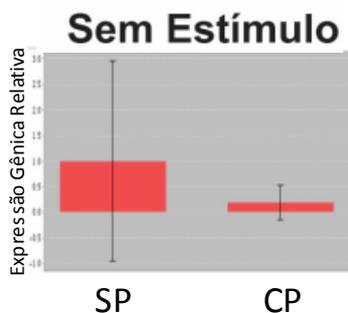


Gráfico 2: Expressão de mRNA de caspase 9 (CASP9) em células de indivíduos sem periodontite (SP) e com periodontite (CP) cultivadas sem estimulação antigênica. ** $p=0,0027$

O processo inflamatório nos tecidos periodontais pode resultar em morte celular, pois o desfecho mais comum num quadro inflamatório/infeccioso é o dano tecidual por necrose. Entretanto, um corpo de estudos tem demonstrado a indução ou inibição de mecanismos de apoptose em diferentes tipos celulares frente ao desafio por microrganismos orais e/ou seus componentes moleculares isolados (WANG, 2015; DITTMANN, 2015; AO, 2014; YOSHIMOTO, 2014; ZHAO, 2014; LI, 2014; BOSTANCI, 2013). A regulação negativa de CASP9 por HmuY de *P. gingivalis* sugere o seu papel em impedir a ativação da cadeia sinalizadora da via intrínseca em nível transcricional em células de pessoas com periodontite crônica. A caspase 9 é uma cisteína peptidase iniciadora de caspase que cliva e ativa caspases executoras (3 e 7), levando à apoptose. (STEPHEN, 2010). Este pode ser um dos mecanismos pelos quais a bactéria interage com o sistema imune do hospedeiro, perpetuando a inflamação nos sítios infectados.

CONCLUSÃO

A proteína HmuY, produzida por *P. gingivalis*, diminui a expressão gênica relativa para CASP9 em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com periodontite.

REFERÊNCIAS

- AO, M.; MIYAUCHI, M.; INUBUSHI, T.; KITAGAWA, M.; FURUSHO, H.; ANDO, T.; AYUNINGTYAS, N.F.; NAGASAKI, A.; ISHIHARA, K.; TAHARA, H.; KOZAI, K.; TAKATA, T. Infection with *Porphyromonas gingivalis* exacerbates endothelial injury in obese mice. **PLoS One**. v.9, p.e110519, 2014
- BOSTANCI, N.; THURNHEER, T.; ADU SE-OPOKU, J.; CURTIS, M.A.; ZINKERNAGEL, A.S.; BELIBASAKIS, G.N. *Porphyromonas gingivalis* regulates TREM- 1 in human polymorphonuclear neutrophils via its gingipains. **PLoS One**. v.8, p.e75784, 2013.
- CARVALHO-FILHO, P.C.; TRINDADE, S.C.; OLCZAK, T.; SAMPAIO, G.P.; OLIVEIRA-NETO, M.G.; SANTOS, H.A.; PEREIRA, B.F.; MOURA-COSTA, L.

XAVIER, M.T.; MEYER, R.; *Porphyromonas gingivalis* HmuY stimulates expression of Bcl-2 and Fas by human CD3+ T cells. **BMC Microbiol.** v.13, p.206, 2013.

CHAPPLE IL. Periodontal diseases in children and adolescents: classification, aetiology and management. **Dental update.** 1996;23(5):210-6.

DITTMANN, C.; DOUEIRI, S.; KLUGE, R.; DOMMISCH, H.; GABER, T.; PISCHON, N. *Porphyromonas gingivalis* Suppresses Differentiation and Increases Apoptosis of Osteoblasts From New Zealand Obese Mice. **J Periodontol.** v.86, p.1095-1102, 2015

GOMES-FILHO, I.S.; CRUZ, S.S.; REZENDE, E.J.; DOS SANTOS, C.A.; SOLEDADE, K.R.; MAGALHÃES, M.A, et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity low birth weight. **J periodontal.** v.34, p.957- 963, 2007.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R.J. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. **Eur. J. Immunol.** v.44, p. 328-338, 2014.

KINANE, D.F; STATHOPOULOU P.G; PAPAPANOU P.N. Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, 2017.

LI, Q.; PAN, C.; TENG, D.; LIN, L.; KOU, Y.; HAASE, E.M.; SCANNAPIECO, F.A.; PAN, Y. *Porphyromonas gingivalis* modulates *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis of respiratory epithelial cells through the STAT3 signaling pathway. **MicrobesInfect.** v.16, p.17-27, 2014.

PAGE, R.C.; EKE, P.I. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. **J Periodontol.** v.78, p.1387-1399, 2007.

STEPHEN, W.G.; GREEN, T.D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** v.11, p.621- 632, 2010.

TRINDADE, S.C.; OLCZAK, T.; GOMES-FILHO, I.S.; MOURA-COSTA, L.F.; VALE, V.C.; GALDINO-NETO, M.; SANTOS, H.A.; CARVALHO-FILHO, P.C.; STOCKER, A.; BENDICHO, M.T.; XAVIER, M.T.; CERQUEIRA, E.M.M.; MEYER, R. *Porphyromonas gingivalis* HmuY-induced production of interleukin-6 and IL-6 polymorphism in chronic periodontitis. **J Periodontol.** v.84, p.650-655, 2013.

TRINDADE, S.C.; OLCZAK, T.; GOMES-FILHO, I.S.; MOURA-COSTA, L.F.; CERQUEIRA, E.M.; GALDINO-NETO, M.; 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. **J Periodontal Res.** v.47, p.27-32, 2012.

WANG, Q.; SZTUKOWSKA, M.; OJO, A.; SCOTT, D.A.; WANG, H.; LAMONT, R.J. FOXO responses to *Porphyromonas gingivalis* in epithelial cells. **Cell Microbiol.** v.12459, 2015.

YOSHIMOTO, T.; FUJITA, T.; OUHARA, K.; KAJIYA, M.; IMAI, H.; SHIBA, H.; KURIHARA, H.. Smad2 is involved in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induced apoptosis. **J Dent Res.** v.93, p.1148-1154, 2014.

ZHAO, P.; LIU, J.; PAN, C.; PAN, Y. NLRP3 inflammasome is required for apoptosis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-infected human osteoblastic MG63 cells. **Acta Histochem.** v.116, p.1119-1124, 2014.