



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

EXPRESSÃO GÊNICA DE TNFSF10 (TRAIL) EM CMSP DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE PERIODONTITE

**Maiara Brito da Silva¹; Soraya Castro Trindade²; Ísis Carolina de Oliveira
Cordeiro³ e Paulo Cirino de Carvalho Filho⁴**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: maiarambs25@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: soraya@uefs.br
3. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: isiscarolinaoc@gmail.com
4. Pesquisador, Curso de Odontologia, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, e-mail: pauloccfilho@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Periodontite Crônica, TNFSF10, Apoptose.

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória multifatorial crônica associada a biofilme de placa disbiótica e caracterizada por destruição do aparelho de suporte dentário. Suas características principais incluem a perda de suporte do tecido periodontal, manifestada através de perda de inserção clínica e alveolar avaliada radiograficamente perda óssea, presença de bolsa periodontal e sangramento gengival (PAPAPANOU et al., 2018). A periodontite é uma doença multifatorial, com participação significativa do hospedeiro, fatores ambientais e bacterianos. No entanto, é a resposta inflamatória do hospedeiro que leva a maior parte da destruição do tecido mole e duro (Huang N, Gibson FC.,2014). A diversidade microbiana da cavidade oral é imensa, tendo patógenos-chave como *Porphyromonas gingivalis* (Pg), que produz fatores de virulência (a exemplo, a proteína HmuY) que provocam respostas da imunidade inata e adaptativa.(TRINDADE et al, 2012; HUANG N, GIBSON FC,2014). Uma dessas respostas é a apoptose celular, sendo um dos elementos importantes o ligante TNFSF10(TRAIL). A HmuY parece atuar no processo de morte celular programada, o que pode prolongar a destruição tecidual (TRINDADE et al, 2012). No presente estudo, foi avaliada a expressão gênica da molécula indutora de apoptose TNFSF10 (TRAIL) em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) humanas em indivíduos com periodontite e sem periodontite, na busca da compreensão dos mecanismos de interação do patógeno com as vias de apoptose na periodontite.

MATERIAL E MÉTODOS

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. Foram executadas a fase de

avaliação periodontal, coleta de sangue, cultura de células e extração de RNA, confecção de cDNA, técnica do arranjo de PCR em tempo real e procedimento de análise de dados, com confecção de mapa de calor.

Os participantes do estudo foram examinados de acordo com os descritores clínicos periodontais segundo Gomes-Filho et al.,2018. Todos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Os seguintes critérios de não inclusão dos participantes foram avaliados pela anamnese: diabetes, hipertensão, doenças auto-imunes, doenças reumáticas, gestação atual, tratamento periodontal anterior, tabagismo atual ou anterior, uso de antibióticos e antiinflamatórios, respectivamente, nos três e um meses anteriores à coleta. Os participantes receberam as devidas informações sobre a pesquisa, e posteriormente, foram preenchidos os formulários para obtenção e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, permanecendo uma cópia com os mesmos.

Um volume de 20 mL de sangue dos indivíduos foi coletado por punção venosa na fossa ante-cubital com tubo à vácuo estéril (BD-SP) com heparina e submetido à centrifugação. O anel da interface enriquecido de células mononucleares foi coletado, lavado e ressuspenso em meio RPMI para contagem e obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Essas células foram cultivadas em placas de 24 poços por 48h a 37°, em estufa de CO₂, sob o estímulo dos seguintes antígenos: extrato sonicado bruto de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277; proteína recombinante HmuY de *P. gingivalis* A7436. Um poço com células sem estímulo foi mantido na cultura como controle negativo. RNA total foi extraído de todas as amostras da cultura de CMSP e confeccionado o cDNA. A análise da expressão gênica foi feita utilizando um sistema de arranjo de PCR em tempo real (ABI QuantStudio 384-well block) que analisou simultaneamente 42 genes envolvidos em mecanismos de apoptose, reposta de células T, inflamação e receptores celulares. Além dos genes de interesse, as placas continham três controles endógenos que garantiram sensibilidade, especificidade e alta reprodutibilidade dos resultados. Foi feito um recorte para análise da expressão gênica de TNFSF10 (TRAIL).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram recrutados vinte e seis voluntários sem periodontite e vinte com periodontite para participar do estudo, que tiveram a sua condição periodontal avaliada e receberam atendimento odontológico. Entretanto, em razão dos critérios de elegibilidade, apenas oito em cada grupo foram selecionados. Aqueles com diagnóstico de ausência de periodontite também não apresentaram gengivite, com sangramento à sondagem de no máximo, 10%. Todos os que foram diagnosticados com periodontite apresentaram a forma grave da doença (Gomes-Filho et al., 2018).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas variáveis sexo ($p=1,00$), idade ($p=0,223$) e número de dentes presentes na boca ($p=983$).

As CMSP dos indivíduos com periodontite, cultivadas com a proteína recombinante HmuY, apresentaram tendência de menor expressão gênica relativa de TNFSF10 (TRAIL) do que as CMSP de indivíduos sem periodontite, como demonstrado no mapa

de calor (Figura 1). Essa tendência não ocorreu quando as células foram cultivadas sem estímulo.

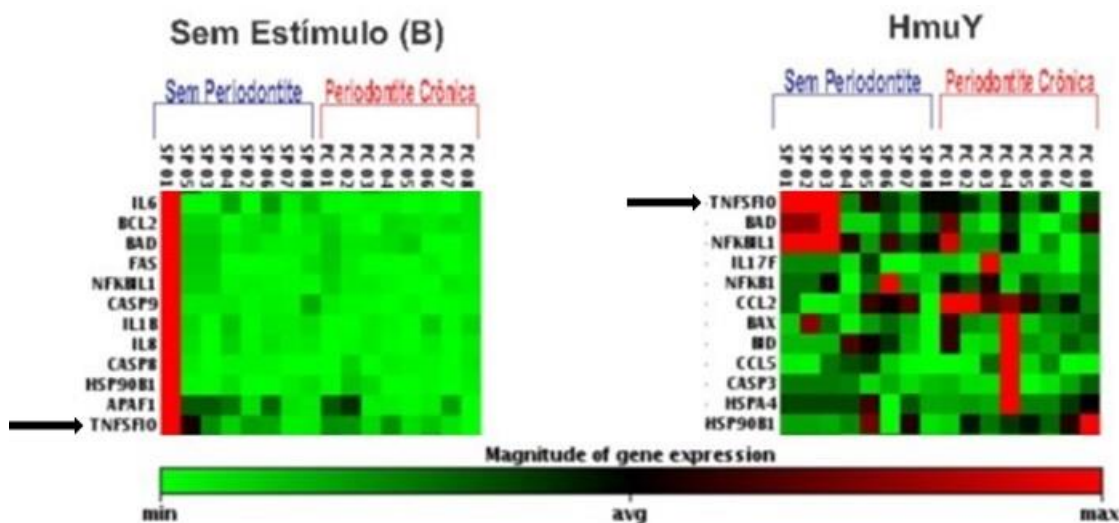


Figura 1: Perfil de Expressão de mRNA - “Heat Map” (Mapa de Calor)

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

A glicoproteína HmuY de *P. gingivalis* diminui a expressão de TNFSF10 (TRAIL), relacionado à via extrínseca de apoptose, em CMSP de indivíduos com periodontite. A HmuY pode capacitar a *P. gingivalis* em um processo de evasão ao sistema imunológico do hospedeiro, contribuindo desta forma para a manutenção do quadro infeccioso/inflamatório na periodontite, aumentando a sobrevivência da *P. gingivalis* por inibição de apoptose.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE-MENDES GP, GRIFFITH TS. 2015. Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond. **Pharmacol Ther.** 15:166-167.
- ARMITAGE GC. 2004. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. **Periodontol 2000.** 34:9-21
- BRUNETTI G, ORANGER A, Mori G, SARDONE F, PIGNATARO P, CORICCIATI M, NAPOLI N, RIZZI R, LISO V, GRASSI FR, GRANO M, COLUCCI S. 2011. TRAIL effect on osteoclast formation in physiological and pathological conditions. **Front Biosci.** 3:1154-1161
- CARVALHO- FILHO PC, TRINDADE SC, OLCZAK T, SAMPAIO GP, OLIVEIRA-NETO MG, SANTOS HA, PEREIRA BF, MOURA- COSTA L, XAVIER MT, MEYER R. 2013. *Porphyromonas gingivalis* HmuY stimulates expression of Bcl-2 and Fas by human CD3+ T cells. **BMC Microbiology.** 13:206.
- CATON, J.G.; ARMITAGE, G.; BERGLUNDH, T.; CHAPPLE, I.L.C.; JEPSEN, S.; KORNMAN, K.S. et al. 2018. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. **J Clin Periodontol.** 45(Suppl 20): S1-S8.
- FIGUEIRA EA, REZENDE MLR, TORRES SA, GARLET GP, LARA VS, SANTOS CF, AVILA-CAMPOS MJ, SILVA JS, CAMPANELLI AP. 2009. Inhibitory Signals Mediated by Programmed Death-1 Are Involved With T-Cell Function in Chronic Periodontitis. **Journal of Periodontology.** 80:1833-1844.

- GOMES- FILHO IS, CRUZ SS, REZENDE EJ, DOS SANTOS CA, SOLEDADE KR, MAGALHAES MA, et al. 2007. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. **Journal of Clinical Periodontology**. 34(11):957-63.
- GOMES-FILHO, I. S. et al. 2018. Clinical diagnosis criteria for periodontal disease: an update. *Journal of Dental Health, Oral Disorders & Therapy*. 9 (5): 354–356. DOI: 10.15406 / jdhodt.2018.09.00408
- HUANG N, GIBSON FC. 2014. Immuno-pathogenesis of Periodontal Disease: Current and Emerging Paradigms. **Current oral health reports**. 1:124-132.
- LINDHE J. 2010. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**, 5ª. Ed. Guanabara Koongan, 2010.)
- LUCAS H, BARTOLD PM, DHARMAPATNI AASSK, HOLDING CA, HAYNES DR. 2010. Inhibition of apoptosis in periodontitis. **Journal of Dental Research**. 89(1):29-33.
- MARSH PD, MOTER A, DEVINE DA. 2011. Dental biofilms: communities, conflicts and control. **Periodontology 2000**. 55 (1): 16-35.
- MORI G, BRUNETTI G, COLUCCI S, CICCOLELLA F, CORICCIATI M, PIGNATARO P, ORANGER A, BALLINI A, FARRONATO D, MASTRANGELO F, TETÈ S, GRASSI FR, GRANO M. 2007. Alteration of activity and survival of osteoblasts obtained from human periodontitis patients: role of TRAIL. **J Biol Regul Homeost Agents**. 21:105-114.
- PAPAPANOU PN, SANZ M, et al. 2018. Periodontitis: Consensus report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 45(Suppl 20):S162–S170.
- TRINDADE SC, OLCZAK T, GOMES- FILHO IS, et al. 2012. *Porphyromonas gingivalis* antigens differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. **Archives of Oral Biology**. 57:314–320.
- YAO, L.; JERMANUS, C.; BARBETTA, B. 2010. *Porphyromonas gingivalis* infection sequesters pro-apoptotic Bad through Akt in primary gingival epithelial cells. **Molecular Oral Microbiology**. 25:89-101.