XXX Congresso de Iniciação Científica UNICAMP

Diferenciação da expressão de citocinas inflamatórias em fibroblastos gengivais de pacientes com diferentes perfis periodontais: estudo in vitro

Palavras-chave: Periodontite, cultura celular, fibroblastos, citocinas.

Autores: Carolina de Almeida Prado Gazzetti Alvarenga*[1], Camila Schmidt Stolf[1], Catharina Marques Sacramento[1], Mauro Pedrine Santamaria[2], Karina Gonzales Silverio Ruiz[1], Marcio Zaffalon Casatti[1], Enilson Antonio Sallum[1], Renato Corrêa Viana Casarin[1].

Instituições:

1.Departamento de Prótese e Periodontia -Faculdade de Odontologia de Piracicaba –UNICAMP, Piracicaba, SP, Brasil.

2.Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos -UNESP, São José dos Campos, SP, Brasil.

Introdução

A periodontite é uma doença inflamatória de etiologia multifatorial, desencadeada pela resposta imune-inflamatória do hospedeiro aos periodontopatógenos presentes no biofilme subgengival, caracterizada clinicamente pela destruição óssea e perda de inserção conjuntiva, que se não tratada pode levar a perda dos dentes. **(1)**

Atualmente, a periodontite é classificada em estágios e graus. Independentemente do estágio do diagnóstico, a periodontite pode progredir com taxas diferentes em indivíduos. A estratificação de risco é baseada em fatores de risco bem validados, incluindo tabagismo, diabetes tipo II não controlado, evidência clínica de progressão ou diagnóstico de doença em idade precoce e gravidade da perda óssea em relação à idade do paciente. **(2)**

Além de tais fatores de risco reconhecidos que afetam a taxa de progressão da periodontite, o papel das citocinas é extremamente importante na progressão da doença. Muitos estudos apresentam linhas de pesquisa que vêm sistematicamente mostrando um importante papel das citocinas pró e anti-inflamatórias.

Hoje, sabe-se que a interleucina-10 (IL-10) apresenta funções regulatórias e anti-inflamatórias, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1β e TNF-α. Pesquisas investigaram a IL-4 e IL-10 como biomarcadores importantes, atuando de forma protetora na quebra da perda óssea alveolar, ou seja, atenuando a progressão da doença periodontal. **(3,4)** Além disso, A IL-4 foi determinada por meta-análise como uma citocina que se mostra diminuída em pacientes com periodontite crônica e elevada após o tratamento periodontal **(5)**, indicando seu papel protetor na periodontite.

Por outro lado, estudos investigaram o papel da interleucina-1β (IL-1β) na periodontite crônica e mostraram que a quantidade total dessa citocina no fluido gengival crevicular está relacionada com a gravidade da periodontite. **(6)** Assim como a IL-1β, foram constatados níveis significantemente maiores de IL-6 em indivíduos diagnosticados com periodontite do que com saúde periodontal. **(5)** Além dessas, estudos demonstraram que o Fator de Necrose Tumoral (TNF) participa da patogênese da periodontite, atuando como uma citocina pró-inflamatória, podendo exacerbar a reabsorção óssea, através do aumento da atividade osteoclástica e redução de osteoblastos. **(7)**

Considerando que a disbiose subgengival é um fator determinante para que haja o início da periodontite, diversas espécies vêm sendo identificadas como essenciais para que esse processo ocorra, como a bactéria Aggregatibacter actinomycetencomitans (Aa) que há muito tempo está associada à antiga periodontite agressiva localizada. Os fatores de virulência de Aa interagem com células hospedeiras para iniciar uma resposta inflamatória exacerbada nos tecidos gengivais periodontias. **(8)** Quando em contato com as exotoxinas do Aa, o epitélio oral e o tecido conjuntivo adjacente formam a primeira barreira de defesa contra esse patógeno. **(9)** Resumidamente, o Aa pode migrar facilmente do sulco gengival para o epitélio interno por meio de sua capacidade de aderir às células epiteliais. **(10, 11)** Após penetrar no tecido conjuntivo subepitelial, suas exotoxinas estimulam os fibroblastos gengivais a secretarem citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1β e TNF-α, que iniciarão o processo de defesa contra esse patógeno, confirmando a importância na avaliação da resposta de fibroblastos contra estimulação bacteriana.

Posteriormente, essa resposta imune local recrutará as células inflamatórias da resposta sistêmica, como monócitos e macrófagos, induzindo mudanças nas vias de sinalização e na expressão gênica. **(12)**

Dessa forma, através da avaliação do perfil de expressão proteica de células fibroblásticas gengivais primárias, estimuladas por extrato proteico total de Aa, tanto de indivíduos com Periodontite grau A ou B (PerioAB), quanto de indivíduos com periodontite grau C (PerioC) e de indivíduos com Saúde Periodontal (SP), o presente estudo pretende auxiliar no compreendimento da etiopatogênese da periodontite e seus níveis de progressão, buscando um futuro onde medidas terapêuticas e preventivas para combater essa doença se tornem mais previsíveis.

Objetivos

O objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de expressão de IL10, IL4, IL6, IL1β e TNF-α por células fibroblásticas primárias de indivíduos com PerioAB, PerioC de indivíduos com saúde periodontal (SP) e, avaliar se este seria alterado pelo estímulo com extrato proteico de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, nos três grupos.

Materiais e Métodos

Para a realização do projeto, foi delineado um estudo laboratorial, envolvendo cultura de células de origem primária, colhidas e isoladas de 5 pacientes com PerioAB, 5 pacientes com PerioC e 5 com SP, os quais apresentavam necessidade de realização de cirurgias orais. Além disso, os pacientes diagnosticados com periodontite deviam estar em fase de terapia periodontal de suporte. O grupo controle foi representado por células não estimuladas pelo extrato bacteriano.

A seleção dos pacientes foi de acordo com os seguintes de inclusão e exclusão:

- PerioAB: perda óssea radiográfica em pacientes com até 35 anos de idade; pelo menos 20 dentes presentes, sendo 8 com PS ≥ 5 mm e SS em 3 dentes não contíguos. **(13, 14)**
- PerioC: perda óssea radiográfica em pacientes maiores de 35 anos de idade; pelo menos 20 dents presentes, sendo 8 dentes com PS ≥ 5 mm e SS em 3 dentes não contíguos. **(13, 14)**
- SP: Índice de sangramento gengival – IG, e sangramento a sondagem – SS < 10%, nível de inserção clínica – NIC ≤ 3mm; **(15)**
- Critérios de Exclusão para todos os grupos: alterações sistêmicas ou uso de medicamentos que possam influenciar na resposta ao tratamento periodontal, nos 6 meses anteriores ao estudo; realização de tratamento periodontal incluindo instrumentação subgengival nos 6 meses anteriores ao estudo; hábito tabagista, gravidez ou período de lactação.

Isolamento e cultivo celular

Para a obtenção da cultura primária de fibroblastos gengivais (FGs) foi adotado o protocolo de Silvério et al (2010). **(16)** Foram coletadas biópsias de tecido conjuntivo e esses foram colocados em meio de cultura padrão. Em seguida, esses FGs foram expandidos até que atingissem 80% de confluência. Após expansão, as células foram colocadas em uma solução de Tripsina 0,25% e EDTA 2,21mM e congeladas em nitrogênio líquido até o experimento, utilizando-se como meio de congelamento o DMSO (Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA).
As células utilizadas para os experimentos foram as células entre a segunda e quarta passagens e os experimentos foram realizados em triplicata.

Obtenção do extrato total da Aggregatibacter actinomycetemcomitans

A cepa utilizada foi cedida pela FIOCRUZ/Manguinhos e foi armazenada na área de Periodontia (FOP/UNICAMP). As células foram reativadas em meio BHI Ágar e foram deixadas por 24h para crescimento em 5% de $C0_2$. Para a extração do extrato total do *Aa* (*Aa*PE) foi utilizado o protocolo descrito por Albiero et al (2017) **(17)**, onde foi acrescentado 700µl de água ultrapura e ≈0,16g de beads de zircônia 0.1mm de diâmetro (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, EUA). Os microtubos foram levados em aparelho Mini-BeadBeater (Biospec) em força máxima. As amostras foram centrifugadas duas vezes e o sobrenadante livre de beads teve a concentração proteica dosada pelo reagente de Bradford (Sigma).

Avaliação da viabilidade celular

Para a determinação da viabilidade celular foi feito um ensaio de MTT onde os FGs de cada grupo foram desafiados com 1 a 25 µg/mL de extrato proteico de Aa. Ao final desse ensaio, escolheu-se duas concentrações que não comprometeram a viabilidade celular: uma maior e uma menor (5 e 20 µg/mL, respectivamente).

Exposição ao extrato do Aa e identificação da especificidade do estímulo bacteriano

Foi feita a estimulação dos FGs por *Aa*PE nas concentrações de 5 e 20 µg/mL (concentrações que não comprometeram a viabilidade celular determinada no ensaio de MTT) por 1.5 e 3 horas. Após cultivo e estimulação, o RNA foi coletado seguindo o protocolo do reagente TRIzol (Invitrogen) e congelado a -80ºC para posterior extração e análise de expressão gênica.

Análise de expressão gênica

Após a coleta do RNA total das células, a qualidade e a concentração de RNA foram medidas através de um espectrofotômetro (Nanodrop 2000, 10 Thermo Scientific) e 10µL de alíquotas do sobrenadante foram usadas para sintetizar a fita complementar de DNA (Roche Diagnostic Co., Indianapolis) em um volume final de 20µl. O qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) foi realizado pela tecnologia LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostic Co.) para detecção dos genes IL10, IL4, IL6, IL1β e TNFα. Cada experimento foi realizado em triplicata, utilizando a água como controle negativo. O nível de expressão gênica foi determinado através do método cycle threshold (Ct) e o gene 18S foi usado como "housekeeping" gene. A fórmula δCt foi utilizada para calcular o nível de expressão do gene alvo.

Resultados e Discussão

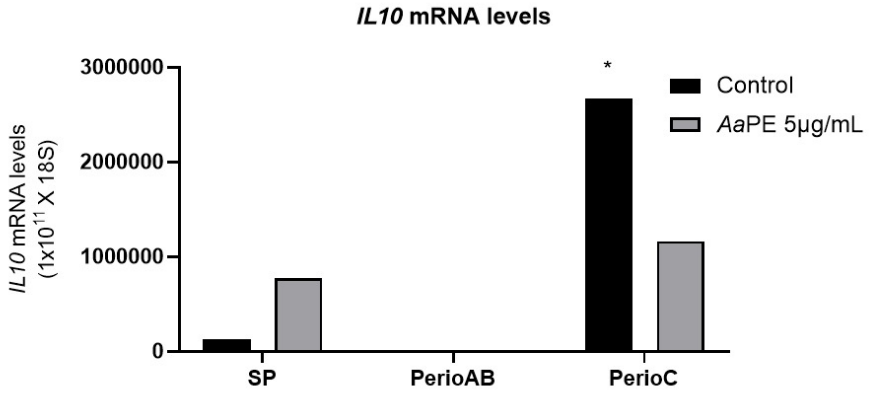

Figura 1. Níveis de expressão de IL-10 em células de pacientes com SP, PerioAB e PerioC.

A Figura 1 apresenta os níveis de expressão da interleucina 10 nas diferentes populações estudadas. Observa-se que esta foi expressa nos grupos de saúde periodontal, tanto no grupo controle quanto no induzido por *Aa*PE. Já nos grupos de periodontite, houve uma diferença estatística entre os grupos controle da PerioAB e controle da PerioC ($p=0.0152$). A interleucina foi expressa em altos níveis apenas na PerioC, podendo ser associada à doença periodontal em seu estágio de rápida progressão. Além disso, o grupo controle da PerioC expressou maiores níveis IL-10 do que as células com estímulo bacteriano, indicando que o estímulo foi responsável pela menor produção de citocina anti-inflamatória.

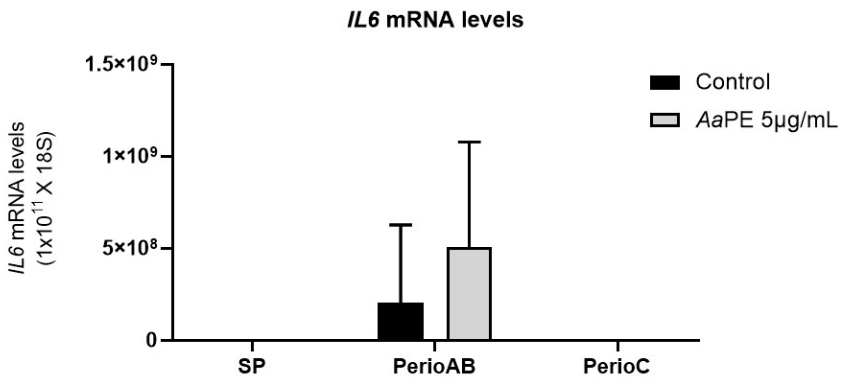

Figura 2. Níveis de expressão de IL-6 em células de pacientes com SP, PerioAB e PerioC.

Apesar da interleucina 6 não apresentar diferenças estatísticas, a Figura 2 nos permite concluir que tal citocina pode ser fortemente associada aos pacientes com doença periodontal de progressão lenta a moderada, visto que a população de PerioAB foi a única que expressou a citocina IL-6. Estudos indicavam que os níveis de IL-6 em indivíduos diagnosticados com periodontite eram significantemente maiores do que em indivíduos com saúde periodontal, porém, nesse estudo, foi possível analisar ainda que a expressão é ainda maior quando as células são estimuladas pelo extrato de *Aa*PE. (5)

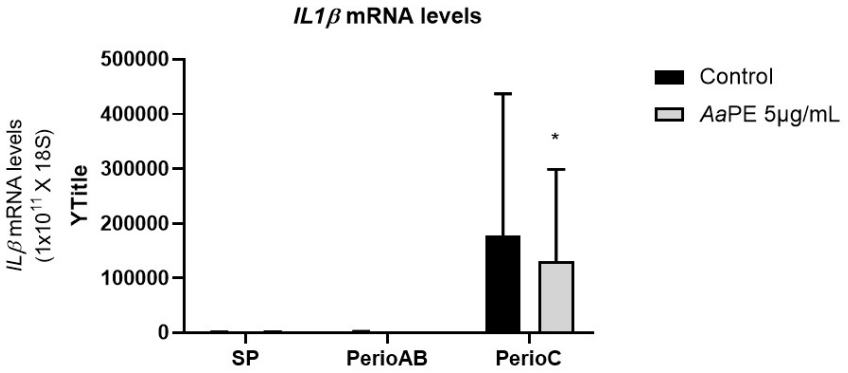

Figura 3. Níveis de expressão de IL1β em células de pacientes com SP, PerioAB e PerioC.

Enquanto a IL-6 está associada à periodontite de progressão lenta a moderada, a Figura 3 nos permite concluir que a interleucina 1β está intimamente relacionada à periodontite de rápida progressão (PerioC), visto que apresentou uma diferença estatística entre o grupo com estímulo bacteriano da PerioAB e o grupo estimulado da PerioC (p=0.0016). Esse resultado se relaciona com outros estudos da área, os quais afirmavam que a quantidade total da interleucina 1β no fluido gengival crevicular estava relacionada com a gravidade da periodontite. (6)

Os resultados da IL-4 e TNFα ainda não foram obtidos, mas de acordo com o cronograma de execução do projeto, terão seus resultados expressos no relatório final.

Conclusão

Podemos concluir que as citocinas IL10, IL6 e IL1β podem apresentar um potencial papel na etiologia da doença periodontal, visto que foram expressas de acordo com cada perfil periodontal. Porém, mais estudos avaliando a sua interação com outras citocinas são necessários.

Bibliografia

1. Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 4(1):1-6.

2. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. J Periodontol. 2018 Jun;89 Suppl 1:S159-S172. doi: 10.1002/JPER.18-0006. Erratum in: J Periodontol. 2018 Dec;89(12):1475. PMID: 29926952.
3. Garlet GP. 2010. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. J Dent Res. 89(12):1349-1363.
4. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. Periodontol 2000. 2010 Feb;52(1):163-206. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00321.x. PMID: 20017801.
5. Stadler AF, Angst PD, Arce RM, Gomes SC, Oppermann RV, Susin C. Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis. J Clin Periodontol. 2016 Sep;43(9):727-45. doi: 10.1111/jcpe.12557. Epub 2016 Jun 23. PMID: 27027257.
6. Gilowski L, Wiench R, Płocica I, Krzemiński TF. Amount of interleukin-1β and interleukin-1 receptor antagonist in periodontitis and healthy patients. Arch Oral Biol. 2014 Jul;59(7):729-34. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.04.007. Epub 2014 Apr 20. PMID: 24798982.
7. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. Int J Oral Sci. 2019 Nov 5;11(3):30. doi: 10.1038/s41368-019-0064-z. PMID: 31685798; PMCID: PMC6828663. 10. Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. Aggregatibacter actinomycetemcomitans, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. Mol Oral Microbiol. 2016 Jun;31(3):207-27. doi: 10.1111/omi.12119. Epub 2015 Sep 22. PMID: 26197893; PMCID: PMC4723285.
8. Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. Aggregatibacter actinomycetemcomitans, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. Mol Oral Microbiol. 2016 Jun;31(3):207-27. doi: 10.1111/omi.12119. Epub 2015 Sep 22. PMID: 26197893; PMCID: PMC4723285.
9. Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, Zambon JJ. Evidence for the role of highly leukotoxic Actinobacillus actinomycetemcomitans in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. J Periodontol. 2000 Jun;71(6):912-22. doi: 10.1902/jop.2000.71.6.912. PMID: 10914794.
10. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Periodontol 2000. 1999 Jun;20:136-67. doi: 10.1111/j.1600-0757.1999.tb00161.x. PMID: 10522226.
11. Meyer DH, Fives-Taylor PM. Characteristics of adherence of Actinobacillus actinomycetemcomitans to epithelial cells. Infect Immun. 1994 Mar;62(3):928-35. doi: 10.1128/IAI.62.3.928-935.1994. PMID: 8112865; PMCID: PMC186205.
12. Belibasakis GN, Johansson A, Wang Y, Chen C, Lagergård T, Kalfas S, Lerner UH. Cytokine responses of human gingival fibroblasts to Actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin. Cytokine. 2005 Apr 21;30(2):56-63. doi: 10.1016/j.cyto.2004.11.008. PMID: 15804596.
13. Casarin RC, Ribeiro Edel P, Mariano FS, Nociti FH, Jr., Casati MZ, Goncalves RB. 2010. Levels of aggregatibacter actinomycetemcomitans, porphyromonas gingivalis, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin g in generalized aggressive and chronic periodontitis. Journal of periodontal research. 45(5):635-642.
14. Taiete T, Casati MZ, Ribeiro Edel P, Sallum EA, Nociti Junior FH, Casarin RC. 2016. Amoxicillin/metronidazole associated with nonsurgical therapy did not promote additional benefits in immunologic parameters in generalized aggressive periodontitis: A randomized controlled clinical trial. Quintessence Int. 47(4):281-292.
15. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. J Periodontol. 2018
16. Silvério KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. J Periodontol. 2010 Aug;81(8):1207-15. doi: 10.1902/jop.2010.090729.
17. Albiero ML, Stipp RN, Saito MT, et al. Viability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament progenitor cells are maintained after incubation with Porphyromonas gingivalis protein extract. J Periodontol. 2017;88:e188-e199.