



Expressão da citocina IL-19 frente à exposição celular ao extrato de *Aa* em pacientes com periodontite Grau C: estudo *in vitro*

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

Autores: Carolina de Almeida Prado Gazzetti Alvarenga*¹, Camila Schmidt Stolf¹, Catharina Marques Sacramento¹, Mauro Pedrine Santamaria², Karina Gonzales Silverio Ruiz¹, Marcio Zaffalon Casatti¹, Enilson Antonio Sallum¹, Renato Corrêa Viana Casarin¹.

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, caracterizada clinicamente pela destruição óssea e perda de inserção conjuntiva, que se não tratada pode levar a perda dos dentes (Armitage, 1999). A Periodontite Grau C (Perio4C) é uma forma particularmente grave de doença periodontal, que acomete indivíduos jovens sistemicamente saudáveis, caracterizada por início precoce, rápida progressão e pobre resposta as abordagens terapêuticas, o que pode levar a dificuldades clínicas em seu tratamento e edentulismo precoce (Albandar, 2014; Armitage, 1999; Deas and Mealey, 2010). A resposta imune desses pacientes apresenta um perfil hiperinflamatório, com um desequilíbrio entre a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias após a ativação das células inflamatórias por periodontopatógenos (Bastos, 2009; Duarte, 2010; Shaddox, 2010).

A etiopatogenia da Perio4C ainda não é completamente compreendida, embora acredite-se que a susceptibilidade dos indivíduos à periodontite é determinada por uma complexa interação entre microbiota, sistema imune e fatores comportamentais, sendo regulada por fatores genéticos (Laine et al. 2012).

A interleucina-19 (IL-19) é uma citocina da super-família da interleucina-10. Hoje sabe-se que a IL-10 apresenta funções regulatórias e anti-inflamatórias, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, se relacionando à baixa severidade da doença periodontal (Garlet 2010; Garlet et al. 2006). Existem pelo menos cinco novas moléculas humanas relacionadas à família da IL-10 que estão envolvidas na regulação imune e respostas inflamatórias, funcionando como mediadoras de diversas atividades, incluindo supressão imunológica, imunidade antibacteriana aprimorada, atividade antitumoral e promoção da auto tolerância em doenças autoimunes (Conti et al., 2003).

A IL-19 têm se destacado nos últimos tempos por sua relação com outras doenças inflamatórias sistêmicas, distúrbios alérgicos, como a asma e doenças autoimunes, como a artrite reumatoide (Rutz et al., 2014; Azuma et al., 2011). Além disso, a expressão aumentada dessa molécula em tecidos humanos inflamados sugere que ela desempenha um papel importante na patogênese de doenças inflamatórias (Conti P., et al., 2003). Porém, os fatores específicos derivados de patógenos que induzem essa citocina é desconhecido, bem como o real impacto que ela representa em diferentes doenças inflamatórias, como a Periodontite Grau C.

Objetivos

O objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de expressão de IL-19 de células fibroblásticas isoladas de indivíduos com Perio4C e de indivíduos com saúde periodontal (SP) e, avaliar se este seria alterado pelo estímulo com extrato proteico de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em ambos os 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 8 pacientes com Perio4C e 8 com SP, os quais apresentavam necessidade de realização de cirurgias orais. Além disso, os pacientes diagnosticados com Perio4C 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 feita de acordos com os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

- **Critérios de inclusão Perio4C:** perda óssea radiográfica, pelo menos 20 dentes presentes, sendo 8 com PS \geq 5 mm, SS em 3 dentes não contíguos (Casarin et al., 2012, Taiete et al., 2016);
- **Critérios de Inclusão SP:** PS \leq 3mm, SS $<$ 10%, NIC \leq 3mm e ausência de perda óssea interproximal radiográfica (Caton et al., 2018);
- **Critérios de Exclusão para os dois grupos:** Alterações sistêmicas ou uso de medicamentos - 6 meses; grávidas e lactantes; tratamento periodontal prévio.

1. Isolamento e Cultivo celular

Para a obtenção da cultura primária de fibroblastos gengivais (FGs) foi adotado o protocolo de Silvério et al (2010). Foram coletadas biópsias de tecido conjuntivo dos dois grupos e esses foram colocados em meio de cultura padrão. Em seguida, esses fibroblastos gengivais 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.

As células utilizadas para os experimentos foram as células entre a segunda e quarta passagens e os experimentos foram realizados em triplicata.

2. Obtenção do extrato total de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A cepa JP2 do patógeno periodontal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) foi cedida pela FIOCRUZ/Manguinhos e foram armazenadas na área de Periodontia (FOP/UNICAMP).

As células foram reativadas em meio BHI Ágar e foram deixadas por 24h para crescimento em 5% de CO₂. Para a extração do extrato total do Aa (AaPE) foi utilizado o protocolo descrito por Albiero et al (2017). As bactérias crescidas foram resuspendidas em solução salina para lavagem. Após centrifugação e descarte da solução salina, as células foram resuspendidas em 700µl de água ultrapura e levadas à microtubos com tampa de rosca, aos quais foram acrescentados \approx 0,16g de beads de zircônia. Os microtubos foram levados em aparelho Mini-BeadBeater (Biospec) em força máxima (3 ciclos de 60 segundos com 1 min de descanso em gelo). Por último, o sobrenadante (AaPE) livre de beads foi transferido a outro microtubo, vortexado (10s) e teve a concentração proteica dosada pelo reagente de Bradford (Sigma).

3. Ensaio de MTT

Para a determinação da viabilidade celular foi feito um ensaio de MTT onde os FGs de uma população de Perio4C, grupo mais susceptível ao A α PE, foram desafiados com 0 a 25 de μ g/mL desse extrato proteico. Ao final desse ensaio, escolheu-se duas concentrações que não comprometeram a viabilidade celular: uma maior e uma menor (5 e 20 μ g/mL, respectivamente).

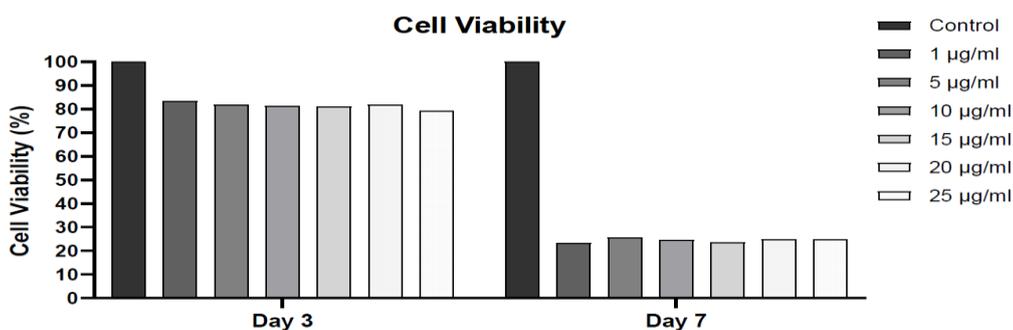


Figura 1. Efeito do A α PE na viabilidade celular. Os FGs foram desafiados 0 (controle) a 25 μ g/mL de A α PE, e o ensaio de MTT para acessar o metabolismo e a viabilidade celular foi realizado nos dias 3 e 7. *Indica diferença estatística entre SP e Perio4C ($p \leq 0,05$).

4. Exposição ao extrato de A α PE e Análise imunoenzimática

Foi feita a estimulação dos FGs por A α PE nas concentrações de 5 e 20 μ g/mL (concentrações que não comprometeram a viabilidade celular determinada no ensaio de MTT) por 1.5 e 3 horas. As células também foram estimuladas por PMA, que é um potente indutor de inflamação inespecífico, para que fosse feita uma comparação entre os grupos e estímulos e identificássemos qual é o fator determinante de uma resposta inflamatória alterada.

O sobrenadante celular foi coletado e logo após foram quantificadas as concentrações da citocina pela tecnologia Luminex/MAGpix.

Resultados

A tabela 1 mostra os dados clínicos e demográficos dos pacientes incluídos no estudo, onde houve uma diferença estatística para o índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e sítios com profundidade de sondagem ≥ 5 mm.

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos dos participantes do estudo. *Indica a diferença estatística entre SP e Perio4C ($p \leq 0,05$).

	SP (n=8)	Perio4C (n=8)
Idade (anos)	26.0 \pm 5.7	35.0 \pm 6.9*
Gênero (feminino/masculino)	7/2	6/2
Etnia (caucasiano/africano)	9/0	6/2
Índice de Placa (%)	4.0 \pm 4.6	25.0 \pm 16.6*
Sangramento à sondagem (%)	3.2 \pm 1.1	33.0 \pm 15.9*

Profundidade de sondagem (PD) (%)	1.6 ± 0.3	3.2 ± 0.8*
Sítios com PD ≥ 5mm (%)	0	18.0 ± 14.2*

Os pacientes portadores de Perio4C apresentaram níveis basais de IL-19 diminuídos em comparação aos indivíduos com SP, nos tempos de coleta de 1.5 e 3h ($p = 0.0457$ e 0.0008 , respectivamente). Esses pacientes também responderam com menores concentrações de IL-19 após estímulo com AaPE em ambas as concentrações do que os pacientes saudáveis ($p < 0.0001$).

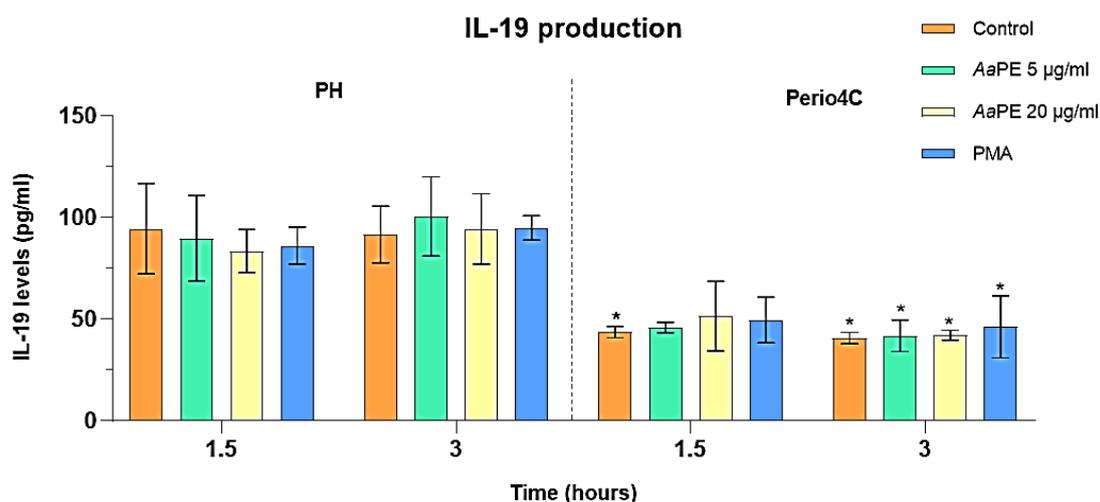


Figura 2. Produção de interleucina-19 em Saúde Periodontal (SP) e Periodontite Grau C (Perio4C) em 1,5 e 3 horas após a exposição celular com 5 e 20 µg/ml de AaPE e PMA. *Indica a diferença estatística entre SP e Perio4C ($p \leq 0,05$).

Além disso, o grupo controle de Perio4C apresentou níveis de IL-19 diminuídos em ambos os tempos, ou seja, independente do estímulo celular, indicando uma falta de produção dessa citocina por essas células e um potencial papel anti-inflamatório que ela pode trazer durante a progressão da doença periodontal.

Conclusão

Podemos concluir que a IL-19 pode apresentar um potencial papel na etiologia da Perio4C, uma vez que células fibroblásticas dos indivíduos portadores dessa doença produzem menores quantidades dessa citocina. Porém, mais estudos avaliando a sua interação com outras citocinas são necessários.

Relevância Clínica

Esse estudo auxiliou no entendimento da etiopatogênese da Perio4C, buscando um futuro em que medidas terapêuticas e preventivas para combater essa doença se tornem mais previsíveis.

Bibliografia

1. Albandar JM. 2014. Aggressive and acute periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 65(1):7-12.

2. 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.
3. Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 4(1):1-6.
4. Azuma YT, Nakajima H, Takeuchi T. IL-19 as a potential therapeutic in autoimmune and inflammatory diseases. *Curr Pharm Des.* 2011 Nov;17(34):3776-80. Review.
5. Bastos MF, Lima JA, Vieira PM, Mestnik MJ, Faveri M, Duarte PM. 2009. Tnf-alpha and il-4 levels in generalized aggressive periodontitis subjects. *Oral Dis.* 15(1):82-87.
6. 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.
7. 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
8. Conti P, Kempuraj D, Frydas S, Kandere K, Boucher W, Letourneau R, Madhappan B, Sagimoto K, Christodoulou S, Theoharides TC. IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Immunol Lett.* 2003 Sep 8;88(3):171-4.
9. Deas DE, Mealey BL. 2010. Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment. *Periodontol 2000.* 53:154-166.
10. Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Bastos MF, Faveri M. 2010. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: A pilot study. *Journal of periodontology.* 81(7):1056-1063.
11. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Martins W, Jr., Silva JS. 2006. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: A stop signal for disease progression? *J Periodontal Res.* 41(6):580-584.
12. Garlet GP. 2010. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res.* 89(12):1349-1363.
13. Laine ML, Crielaard W, Loos BG. 2012. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol 2000.* 58(1):37-68.
14. Myles, IA et al. A sinalização através do receptor de IL-20 inibe a produção cutânea de IL-1 β e IL-17A para promover a infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. *Nature Immunol.* 14, 804–811 (2013).
15. Rutz, S., Wang, X. & Ouyang, W. The IL-20 subfamily of cytokines — from host defence to issue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, 783–795 (2014)
16. Shaddox L, Wiedey J, Bimstein E, Magnuson I, Clare-Salzler M, Aukhil I, Wallet SM. 2010. Hyper-responsive phenotype in localized aggressive periodontitis. *J Dent Res.* 89(2):143-148.
17. 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.
18. 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.