



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**PAULO CIRINO DE CARVALHO FILHO**

**PRODUÇÃO DE CITOCINAS E EXPRESSÃO DE mRNA POR  
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO SOB  
ESTÍMULO DE rHmuY DE *Porphyromonas gingivalis* NA  
PERIODONTITE CRÔNICA**

**Salvador, BA  
2015**

PAULO CIRINO DE CARVALHO FILHO

**PRODUÇÃO DE CITOCINAS E EXPRESSÃO DE mRNA POR  
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO SOB  
ESTÍMULO DE rHmuY DE *Porphyromonas gingivalis* NA  
PERIODONTITE CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Soraya Castro Trindade  
Co-orientadora: Profa. Dra. Marcia Tosta Xavier

**Salvador, BA  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,  
**Sistema de Bibliotecas da UFBA**

C331 Carvalho Filho, Paulo Cirino de.

Produção de citocinas e expressão de mRNA por células mononucleares de sangue periférico sob estímulo de rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* na periodontite crônica / Paulo Cirino de Carvalho Filho. - Salvador, 2015.  
143 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Soraya Castro Trindade.

Tese (Doutorado em Imunologia) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2015.

1. Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real. 2. Proteínas de bactérias. 3. Apoptose. 4. Resposta inflamatória. 5. *Porphyromonas gingivalis*. 6. Periodontite crônica - Imunologia. I. Trindade, Soraya Castro. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

CDU: 616.311.2-002



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



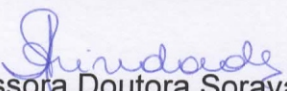
TERMO DE APROVAÇÃO

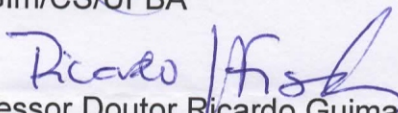
**“PRODUÇÃO DE CITOCINAS E EXPRESSÃO DE mRNA POR CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO SOB ESTÍMULO DE rHmuY DE *Porphyromonas gingivalis* NA PERIODONTITE CRÔNICA”**

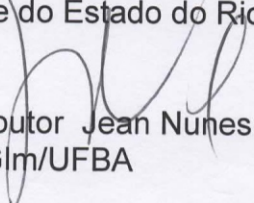
**Doutorando – Paulo Cirino de Carvalho Filho  
Orientadora- Profa. Dra. Soraya Castro Trindade**

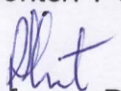
Trabalho de Defesa de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia como requisito necessário para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

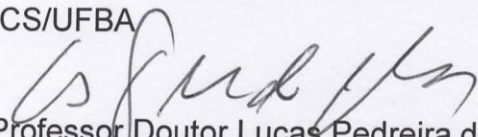
BANCA EXAMINADORA

  
Professora Doutora Soraya Castro Trindade – orientadora  
PPGIm/CS/UFBA

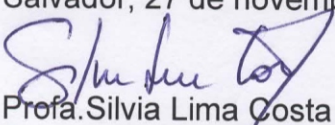
  
Professor Doutor Ricardo Guimarães Fischer  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro- UERJ

  
Professor Doutor Jean Nunes dos Santos  
Odonto/PPGIm/UFBA

  
Professor Doutor Ryan dos Santos Costa  
ICS/UFBA

  
Professor Doutor Lucas Pedreira de Carvalho  
PPGIm/FIOCRUZ/UFBA

Salvador, 27 de novembro de 2015

  
Profa. Silvia Lima Costa  
Coordenadora do PPGIm  
ICS-UFBA

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os desafios superados e pelas grandes vitórias na vida.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Soraya C. Trindade, por ser uma pessoa muito especial, capaz e dedicada contribuindo enormemente para minha formação profissional desde a minha graduação, transmitindo sabiamente seus ensinamentos e consolidando uma parceria e amizade que abrilhantou meus passos nesta jornada.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Tosta, por toda a dedicação, amizade, inteligência e extrema competência no desenvolvimento deste trabalho, sempre muito atenta e exigente, estimulando brilhantemente o meu desenvolvimento científico.

Ao Prof. Dr. Roberto Meyer, por quem tenho muito respeito e admiração, pelo empenho na realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvia Lima Costa, por toda a sua contribuição para o meu ingresso no Programa de Pós-Graduação em Imunologia e pela revisão dos manuscritos.

Ao Prof. Dr. Ryan dos Santos Costa pela ajuda importantíssima na execução deste trabalho, colaborando imensamente para a obtenção dos resultados do presente estudo.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lília e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Camila pelo apoio e ajuda na utilização de seus laboratórios, contribuindo enormemente para a concretização deste trabalho.

À minha mãe, Inês, que sempre me apoiou em todas as minhas atitudes. E ao meu pai, Paulo (*in memoriam*), que estaria certamente muito orgulhoso desta caminhada profissional.

À minha esposa, Lílian Rodrigues, sempre presente na minha vida, me encorajando na superação dos desafios, me apoiando e me fortalecendo em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Claudio, Carlos e Marcos e às minhas irmãs Rosa, Glória, Eliane, Luciana e Eneida, que sempre me apoiaram e me ajudaram nos momentos mais difíceis e orgulharam-se das grandes vitórias.

Ao meu cunhado, Wilson (*in memoriam*) e meu sobrinho Lucas (*in memoriam*), pelo exemplo de vida e alegria de viver, sempre presentes em meu coração.

À Ana Carla, Patrícia e Sibelle, pessoas muito especiais que caminharam ao meu lado nesta jornada, por toda ajuda e empenho na realização do trabalho.

Aos amigos, Alex, Rosa, Marcos, Mabel, Ryan, Milton, Heide, Itala, Andréia e Tadeu, pela pronta ajuda sempre que precisei.

Aos funcionários do PPGIm, especialmente Dilcea e do Labimuno, Rafaela, Zilda, Chica, Zé, Regi, Manoel, Lí e Mário, pelo carinho.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, especialmente, ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pereira Falcão pela pronta ajuda e apoio na realização deste trabalho. Também aos professores e funcionários da Universidade Estadual de Feira de Santana, que me acolheram de braços abertos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Teresa Olczak, que disponibilizou a proteína recombinante e tornou-se uma parceira importante e respeitada.

"As soluções sempre aparecem quando saímos do pensamento e ficamos em silêncio, absolutamente presentes, ainda que seja só por um instante" (Eckhart Tolle)

CARVALHO-FILHO, P.C. Produção de Citocinas e Expressão de mRNA por Células Mononucleares de Sangue Periférico sob Estímulo de rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* na Periodontite Crônica. 2015. 143f Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador, 2015.

## RESUMO

A periodontite é uma doença multifatorial, com participação significativa do hospedeiro, fatores ambientais e bacterianos. Sua fase inicial é resultante de uma microbiota multiespécie sinérgica e disbiótica, onde patógenos conhecidos como patógenos-chave possuem efeitos em toda comunidade e são componentes críticos no desenvolvimento do processo disbiótico. Nesta categoria encontra-se *Porphyromonas gingivalis*, um bacilo gram-negativo anaeróbico, associado as formas crônicas generalizadas da doença. A resposta do hospedeiro durante a periodontite é complexa, com elementos da imunidade inata e adaptativa que levam à inflamação crônica e destruição progressiva dos tecidos periodontais de suporte. O presente estudo objetivou avaliar a produção de citocinas e o perfil de expressão gênica em cultura de Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP) de indivíduos com periodontite crônica, frente à proteína recombinante HmuY (rHmuY) de *Porphyromonas gingivalis*. As células de 46 voluntários, 26 sem periodontite (SP) e 20 com periodontite crônica (PC), foram cultivadas *in vitro* na ausência de estimulação antigênica e sob estímulos de Pokeweed e de rHmuY por 48 horas. Após o cultivo celular, foi realizado o ensaio imunoenzimático ELISA para avaliar a produção das citocinas IL-1beta, IL-4, IL-10 e IL-18 por CMSP nos sobrenadantes de cultura. Ainda, foi utilizado o arranjo de PCR em tempo real customizado para avaliar a expressão de mRNA de genes relacionados à apoptose, citocinas, quimiocinas e receptores, além de proteínas de choque térmico, fatores de transcrição e inibidor de transcrição. Não foram encontradas diferenças entre os grupos SP e PC na produção de IL-4 e IL-1beta por CMSP estimuladas com rHmuY. Níveis mais elevados de IL-18 foram significativamente induzidos por HmuY e na ausência de estimulação em células do grupo PC. Os níveis de IL-10 foram reduzidos no grupo PC nas células estimuladas com HmuY e houve uma tendência para significância estatística para níveis baixos desta citocina nas células não estimuladas do grupo PC. A expressão de mRNA para CCL2 aumentou significativamente em CMSP sob estímulo HmuY e o mRNA para NFKBIL1 diminuiu significativamente nestas células sob o mesmo estímulo no grupo PC. Entretanto, houve uma tendência para significância estatística para níveis baixos de expressão de mRNA para IL-10 e IL-18 em CMSP em PC. Em comparação com os controles SP, os pacientes do grupo PC apresentaram baixos níveis de expressão de genes relacionados a apoptose (FAS, FAS-LG, TNFSF10 (TRAIL), BAK1, CASP9 e APAF1) quando as CMSP foram estimuladas com HmuY. Ainda, as células de pacientes do grupo PC apresentaram baixos níveis de expressão do gene CASP7 quando as células não foram estimuladas. Nossos achados sugerem que HmuY de *Porphyromonas gingivalis* pode ter um papel importante na modulação das vias intrínseca e extrínseca de apoptose e que esta proteína estimula resposta inflamatória no hospedeiro.

**Palavras-chave:** PCR em tempo real, ELISA, rHmuY, apoptose, resposta inflamatória, periodontite crônica



CARVALHO-FILHO, P.C. Cytokine Production and mRNA Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells under stimuli of *Porphyromonas gingivalis* rHmuY in Chronic Periodontitis. 2015. 143f. Thesis (Doctoral's degree in immunology) - Institute of Health Sciences, UFBA, Salvador, 2015.

### ABSTRACT

Periodontitis is a multifactorial disease, with significant participation of the host, environmental factors and bacterial. Its early stage results from a synergistic and disbiotic multispecies microorganisms where known as “keystone” have effects throughout the community and are critical components in the development of disbiotic process. This category is *Porphyromonas gingivalis*, an anaerobic gram-negative bacilli associated chronic generalized forms of the disease. The host response during periodontitis is complex with components of the innate and adaptive immune system that lead to chronic inflammation and progressive destruction of periodontal tissue support. This study aimed to evaluate the production of cytokines and the profile of gene expression in culture of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) of patients with chronic periodontitis, under stimulation of *Porphyromonas gingivalis* recombinant protein HmuY (rHmuY). The cells of 46 volunteers, 26 non-periodontitis (NP) and 20 chronic periodontitis (CP) were cultured in vitro in the absence of antigenic stimulation and under Pokeweed and rHmuY stimuli for 48 hours. After cell culture, the enzyme immunoassay ELISA was conducted to evaluate the production of cytokines IL-1b, IL-4, IL-10 and IL-18 by PBMC in culture supernatants. Further, PCR was used arrangement in real time customized to evaluate the mRNA expression of apoptosis related genes, cytokines, chemokines and receptors, and heat shock proteins, transcription factors and transcription inhibitor. No differences were found between the NP and CP groups in IL-4 and IL-1beta by PBMC stimulated with rHmuY. Higher levels of IL-18 were significantly induced HmuY in the absence of stimulation in cells of CP group. IL-10 levels were reduced in CP group in cells stimulated with HmuY and there was a trend towards statistical significance for low levels of this cytokine in unstimulated cells CP group. The expression of mRNA for CCL2 increased significantly in PBMC under HmuY stimulus and the mRNA for NFKBIL1 decreased significantly in these cells under the same stimulus in the CP group. However, there was a borderline significance for low levels of mRNA expression for IL-10 and IL-18 in PBMC of CP. Compared to the NP controls, patients in the CP group had low gene expression levels related apoptosis (FAS, FAS-LG, TNFSF10 (TRAIL), BAK1, CASP9 and APAF1) when PBMC were stimulated with HmuY. Further, cells in the CP group patients showed low levels of expression of the gene CASP7 when the cells were not stimulated. Our findings suggest that HmuY of *Porphyromonas gingivalis* can play an important role in the modulation of intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis and that this protein stimulates inflammatory response in the host.

**Keywords:** Real Time PCR Array, ELISA, rHmuY, apoptosis, inflammatory response, chronic periodontitis

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Aa	<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AAP	Academia Americana de Periodontia
ACTB	Beta Actina
APAF-1	“Apoptotic protease-activating factor-1” ou protease ativadora do fator 1 da apoptose
ATCC	“American Type Culture Collection” – Banco de Coleção de Culturas Americanas
BAD	“BCL2-associated agonist of cell death” ou Agonista de morte celular associado à BCL-2
BAK1	“BCL2-antagonist/killer 1” ou BCL2-antagonista/morte 1
BAX	“BCL2-associated X protein” ou Bcl-2 associada à proteína X – Pró-apoptótica
BCL2	“B-cell CLL/lymphoma 2” ou Proteína intra-citoplasmática que inibe a apoptose – Anti-apoptótica
BCL2L1	“BCL2-like 1” – Proteína inibidora de morte celular
BH3	Domínio de homologia à Bcl-2
BID	“BH3 interacting domain death agonist” ou Domínio de interação / BCL-2 – Pró-apoptótica
Bim	Proteína da família Bcl-2 produzida pelo gene bim – Pró-apoptótica
BSA	Albumina Sérica Bovina
CASP3	“Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase” ou Cisteína peptidase relacionada à apoptose 3
CASP7	“Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase” ou Cisteína peptidase relacionada à apoptose 7
CASP8	“Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase” ou Cisteína peptidase relacionada à apoptose 8
CASP9	“Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase” ou ou Cisteína peptidase relacionada à apoptose 9
CCL2/MCP1	“Chemokine (C-C motif) ligand 2” ou Fator quimiotático que atrai monócitos e basófilos

CCL5	“Chemokine (C-C motif) ligand 5” ou Quimiocina tipo CC que é um quimioatraente para eosinófilos, monócitos e linfócitos
CD	“Cluster of Differentiation” – Diferenciação de Grupo
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
F0XP3	“Forkhead box P3” – Fator de transcrição
FAS LG	“Fas ligand (TNF superfamily, member 6)” FAS ligante
FAS/CD95/ APO-1	“FAS (TNF receptor superfamily, member 6)” ou Receptor ou proteína de membrana pró-apoptose
f-Th	“Follicular T helper” - Resposta imune celular com perfil T auxiliar folicular
GAPDH	“Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase” ou gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GATA3	“GATA binding protein 3” ou proteína ligante GATA 3
GUSB	“Glucuronidase, beta” ou Beta glucuronidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Água oxigenada
HCl	Ácido Clorídrico
High-MW	“High Molecular Weigth” – Alto peso molecular
HSP90B1	“Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1” - Gene que codifica a proteína de choque térmico – 90kDA
HSPA4	“Heat shock 70kDa protein 4” - Gene que codifica a proteína de choque térmico – 70kDA
HSPD1	“Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)” - Gene que codifica a proteína de choque térmico – 60kDA
IFNG	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10

IL-11	Interleucina 11
IL-12	Interleucina 12
IL-12A	Interleucina 12A
IL-13	Interleucina 13
IL-17A	Interleucina 17A
IL-17F	Interleucina 17F
IL-18	Interleucina 18
IL-1B	Interleucina 1, beta
IL-2	Interleucina 2
IL-21	Interleucina 21
IL-23A	Interleucina 23A
IL-33	Interleucina 33
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
kDa	Quilodalton
KgP	Gingipaína K
Low-MW	“Low-Molecular Weigth” – Baixo peso molecular
LPS	Lipopolissacarídeo

LT	Linfócito T
LTA	Ácido lipoteicóico
NFKB1	“Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1” ou Fator nuclear ativador da cadeia leve kappa de células B ativadas
NFKBIL1	“Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer In B-cells inhibitor-like 1” – Inibidor da via NFκB
Nm	Nanômetro
PC	Periodontite Crônica
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
RgP	Gingipaína R
RNA	Ácido ribonucléico
RORC	“RAR-related orphan receptor C” – Fator de transcrição
SP	Sem Periodontite
SPSS	“Statistical Package for Social Sciences” – Programa Estatístico para Ciências Sociais
STF	Salina Tamponada com Fosfato
TCR	Receptor de linfócitos T
Td	<i>Treponema denticola</i>
Tf	<i>Tannerella forsythia</i>
TGFB1	“Transforming growth factor, beta 1” – Fator transformador de crescimento beta 1
Th1	Resposta imune celular com perfil 1
Th17	Resposta imune celular com perfil 17
Th2	Resposta imune celular com perfil 2

Th22	Resposta imune celular com perfil 22
Th9	Resposta imune celular com perfil 9
TLR	“Toll-like receptor” – Receptor tipo Toll
TNF	“Tumor necrosis fator” ou Fator de Necrose Tumoral
TNFR	Receptor de TNF
TNFSF10 /TRAIL/AP O-2 Treg	“Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10” – ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF Resposta imune celular com perfil regulatório

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	Sinergia polimicrobiana e disbiose na periodontite	23
<b>Figura 02</b>	Disbiose microbiana e desequilíbrio imunológico	24
<b>Figura 03</b>	Heterogeneidade dos fenótipos de linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	25
<b>Figura 04</b>	Esquema representando as vias intrínsecas e extrínsecas de apoptose	32
<b>Figura 05</b>	Exemplo de curva de amplificação dos genes por PCR Array	45
<b>Figura 06</b>	Perfil de expressão de mRNA – “ <i>Heat Map</i> ”	50

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 01</b>	Produção de citocinas por CMSP nos sobrenadantes de cultura dos grupos SP e PC.	48
<b>Gráfico 02</b>	Expressão de mRNA para IL-10 e IL-18 em CMSP dos grupos SP e PC sob estímulo de rHmuY de <i>P. gingivalis</i> e em células não estimuladas	52
<b>Gráfico 03</b>	Expressão de mRNA para CCL2 em CMSP dos grupos SP e PC sob estímulo de rHmuY de <i>P. gingivalis</i> e em células não estimuladas	53
<b>Gráfico 04</b>	Expressão de mRNA para NFKBIL1 em CMSP dos grupos SP e PC sob estímulos de rHmuY de <i>P. gingivalis</i> e em células não estimuladas	53
<b>Gráfico 05</b>	Expressão de mRNA para gene relacionado às vias intrínseca e extrínseca de apoptose em CMSP dos grupos SP e PC sob estímulo de rHmuY de <i>P. gingivalis</i> e células não estimuladas	54
<b>Gráfico 06</b>	Expressão de mRNA para genes relacionados à via extrínseca de apoptose em CMSP nos grupos SP e PC sob estímulo de rHmuY e sem estimulação	55
<b>Gráfico 07</b>	Expressão de mRNA de genes relacionados à via intrínseca de apoptose em CMSP dos grupos SP e PC sob estímulo de rHmuY e sem estimulação	56



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b>	Genes selecionados para o arranjo de PCR em tempo real	42
<b>Tabela 02</b>	Distribuição das amostras para o arranjo de PCR em tempo real	43
<b>Tabela 03</b>	Programa do termociclador utilizado na análise da expressão gênica	44
<b>Tabela 04</b>	Achados clínicos em indivíduos com periodontite crônica (PC) e sem periodontite (SP)	46
<b>Tabela 05</b>	Expressão genética diferencial entre os grupos PC e SP no estímulo com rHmuY e sem estimulação	50

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b>	20
2.	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	22
2.1	IMUNOPATOGÊNESE DA PERIODONTITE CRÔNICA	22
2.2	DETERMINANTES ANTIGÊNICOS DE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i>	25
2.3	PERIODONTITE CRÔNICA E MORTE CELULAR	29
3.	<b>HIPÓTESES</b>	33
4.	<b>OBJETIVOS</b>	34
4.1	OBJETIVO GERAL	34
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5.	<b>METODOLOGIA</b>	35
5.1	DESENHO DE ESTUDO E TAMANHO DA AMOSTRA	35
5.2.1	SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES	35
5.3	AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO PERIODONTAL	36
5.3.1	DESCRITORES CLÍNICOS	36
5.4	PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO	38
5.4.1	OBTENÇÃO DE HmuY DE <i>P. gingivalis</i>	38
5.5	COLETA DE SANGUE	38
5.6	SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP) E CULTURA CELULAR	38
5.7	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO ELISA PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS	39
5.8	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA	39
5.9	TÉCNICA DO ARRANJO DE PCR EM TEMPO REAL (CUSTOM HUMAN RT <sup>2</sup> PROFILER™ PCR ARRAY)	39
5.10	ANÁLISE DOS DADOS	43
6.	<b>RESULTADOS</b>	44

6.1	PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CMSP	45
6.1.2	IL-1 $\beta$	45
6.1.3	IL-4	45
6.1.4	IL-10	46
6.1.5	IL-18	46
6.2	EXPRESSÃO GÊNICA POR CMSP	47
6.2.1	PADRÃO DE EXPRESSÃO DE mRNA – “HEAT MAP”	47
6.2.2	EXPRESSÃO DE mRNA DE GENES RELACIONADOS À CITOCINAS POR CMSP NOS GRUPOS SP E PC COM E SEM ESTÍMULO DE rHmuY	49
6.2.3	EXPRESSÃO mRNA PARA CCL2 Em CMSP NOS GRUPOS SP E PC COM E SEM ESTÍMULO DE rHmuY	50
6.2.4	EXPRESSÃO DE mRNA PARA NFKBIL1 EM CMSP NOS GRUPOS SP E PC COM E SEM ESTÍMULO DE rHmuY	51
6.2.5	EXPRESSÃO DE mRNA PARA GENES RELACIONADOS À APOPTOSE NAS VIAS INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA DE MORTE CELULAR PROGRAMADA	52
6.2.6	EXPRESSÃO DE mRNA PARA GENES RELACIONADOS À APOPTOSE NA VIA EXTRÍNSECA DE MORTE CELULAR PROGRAMADA	52
6.2.7	EXPRESSÃO DE mRNA PARA GENES RELACIONADOS À APOPTOSE NA VIA INTRÍNSECA DE MORTE CELULAR PROGRAMADA	53
7.	<b>DISCUSSÃO</b>	55
8.	<b>CONCLUSÃO</b>	61
9.	<b>REFERÊNCIAS</b>	62
10.	<b>APÊNDICES</b>	77
11.	<b>ANEXO</b>	

## 1-INTRODUÇÃO

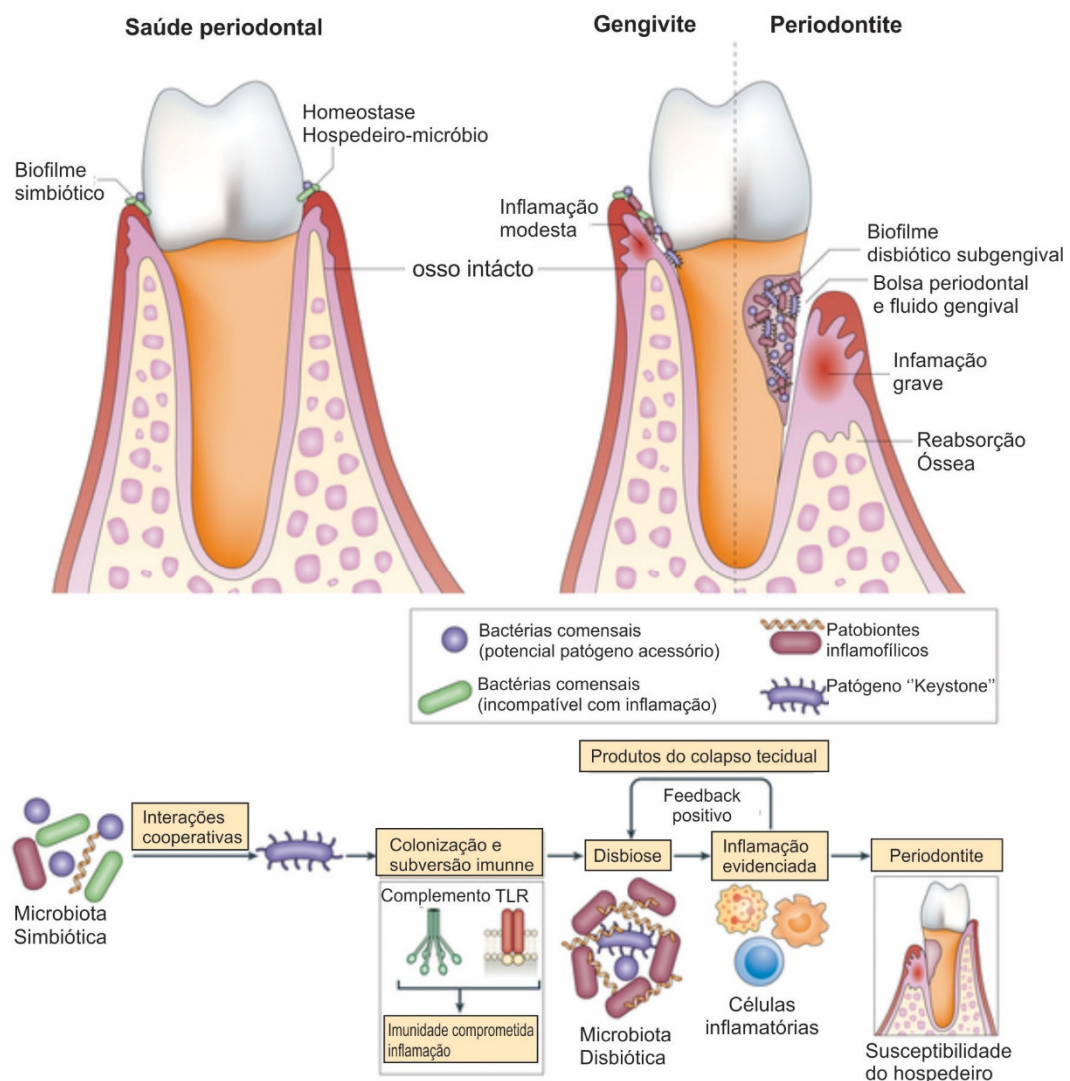
As doenças periodontais são as patologias inflamatórias crônicas mais comuns em humanos (BENAKANAKERE, 2012). Compreende um certo número de condições inflamatórias e infecciosas provocadas pela interação entre os biofilmes supragengival e subgengival e a resposta inflamatória do hospedeiro. A doença periodontal é modulada por sistemas do organismo e podem desempenhar um papel relevante como fator de risco para distúrbios sistêmicos. As evidências atuais na literatura científica suportam algumas dessas interações, como o tabagismo como fator de risco para a doença periodontal e diabetes mellitus, e de que forma ambos são influenciados e influenciam alterações inflamatórias no tecido periodontal. Outras associações potenciais ainda estão sendo investigadas, a saber: Obesidade, alterações hormonais, doenças cardiovasculares, e os resultados adversos na gravidez (OPPERMANN, 2012; NAGPAL, 2015).

As doenças periodontais podem ser descritas como uma série de alterações patológicas que ocorrem no periodonto resultantes de uma resposta inflamatória à agressão de periodontopatógenos presentes no biofilme dental, podendo afetar somente a gengiva, na gengivite ou progredir para o periodonto de sustentação, na periodontite, levando à mobilidade e posterior perda das unidades dentárias acometidas pelo processo patológico (GEMMEL; SEYMOUR, 2004). Clinicamente observa-se na periodontite: reabsorção do osso alveolar, perda de inserção clínica, presença de bolsa periodontal e inflamação gengival (ARMITAGE, 2004).

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. Formas localizadas e agressivas de periodontite estão associadas com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, enquanto as formas crônicas generalizadas da doença com diversas bactérias, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, dentre outras. A diversidade microbiana da cavidade oral é imensa, e a resposta do hospedeiro durante a periodontite é complexa, com elementos da imunidade inata e adaptativa que levam à inflamação crônica e perda óssea (HUANG, 2014).

Recentes estudos metagenômicos e mecanísticos são consistentes com um novo modelo de patogênese periodontal que propõe o início da doença periodontal por uma comunidade microbiana sinérgica e disbiótica, não apenas por um seletivo grupo de bactérias conhecidas como “periodontopatógenos”. Bactérias encontradas em baixa

abundância na microbiota têm efeito em toda comunidade e por serem componentes críticos para o desenvolvimento da disbiose, são conhecidas como patógenos “pedra-chave” ou “pedra-angular” (“*keystone*” em Inglês) (HAJISHENGALLIS & LAMONT, 2014) (Figura 01). O exemplo mais bem documentado é *Porphyromonas gingivalis*, um bacilo Gram-negativo, anaeróbico estrito e assacarolítico da família Bacteroidaceae que tem sido implicado na periodontite humana (SOCRANSKY et al, 1998).



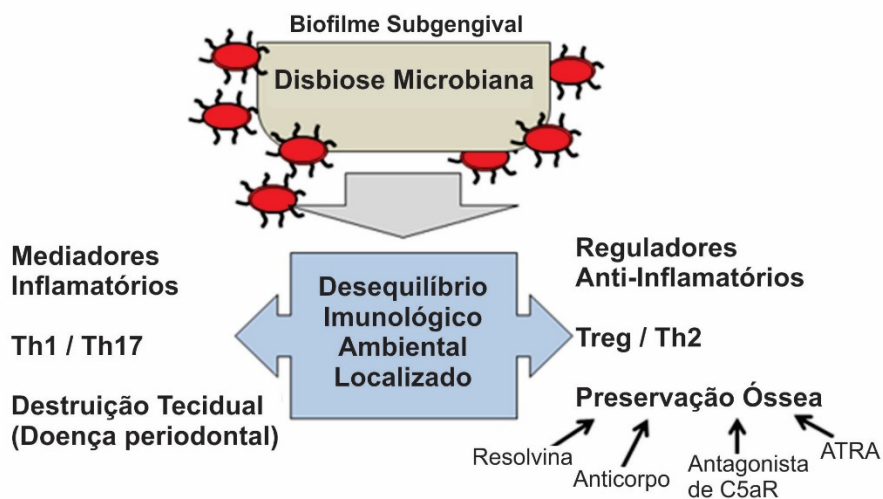
Adaptado de HAJISHENGALLIS, 2015

Figura 01: Sinergia polimicrobiana e disbiose na periodontite.

## 2-REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 IMUNOPATOGENESE DA PERIODONTITE CRÔNICA

A infecção bacteriana é o fator etiológico primário, mas não é suficiente para induzir o início da doença ou sua progressão. Fatores derivados de bactérias estimulam uma reação inflamatória local e ativação do sistema imune inato. A resposta inata envolve o reconhecimento de componentes microbianos por células hospedeiras, e este evento pode ser mediado por receptores semelhantes ao Toll (TLRs) expressos pelas células residentes e leucócitos. A ativação destas células conduz à liberação de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de fagócitos e linfócitos. A ativação de linfócitos T inicia a imunidade adaptativa com resposta Th1, Th2, Th17 e Treg, enquanto os linfócitos B participam deste processo com a produção de anticorpos (BENEDETTO et al., 2013) (Figura 02).



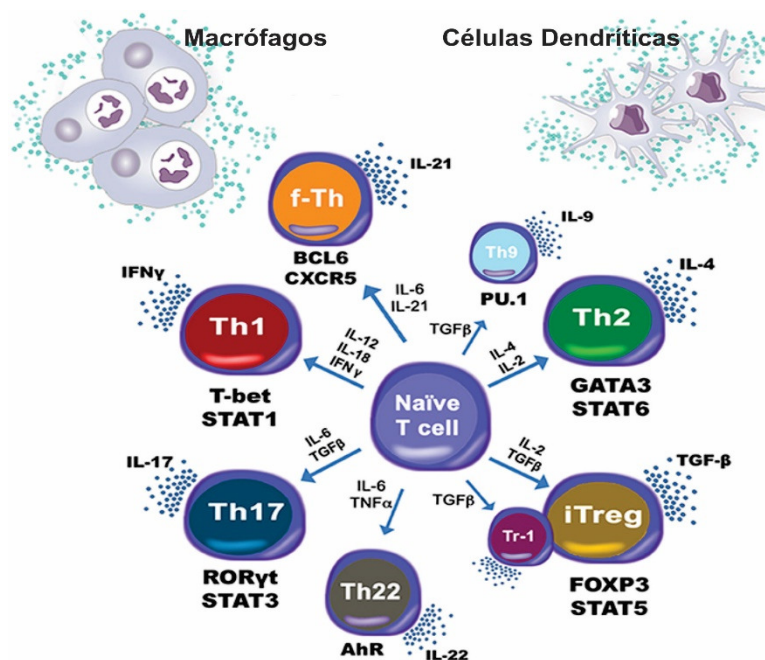
Adaptado de HUANG, 2014

**Figura 02:** Disbiose microbiana e desequilíbrio imunológico.

Atualmente, diversos subconjuntos funcionalmente distintos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ativados foram descritos, cada um produzindo diferentes citocinas e expressando fatores de transcrição. NF-kappaB (NFKB) é um importante fator de transcrição complexo que parece desempenhar um papel fundamental na regulação da inflamação aguda, através da ativação da cascata de citocinas e produção de outros mediadores pró-inflamatórios, incluindo moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM-1, E-selectinas, enzimas como COX-2, 5-LO, cPLA e iNOS e diversas citocinas como IL-1, TNF, IL-6, GM e G-CSF, além de quimiocinas como IL-8, RANTES, MCP-1, MIP-1K e eotaxina

(FUJITA, 2014; CHRISTMAN, 1998; BARNES, 1993). O Estudo de ATZEI et al., (2010) sugeriu a inibição da via NFkB pela ativação do gene NFKBIL1. Segundo NA et al., (2013), a proteína inibidora de “kB-like” (IKBL), codificadas pela ligação HLA-NFKBIL1, é uma proteína de função desconhecida, enquanto que variações genéticas em NFKBIL1 estão associadas com a susceptibilidade para doenças inflamatórias e/ou doenças auto-imunes.

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, são sub-classificados em linfócitos Th1 que expressam o fator de transcrição T-bet e as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF-3; Os linfócitos Th2 que expressam GATA-3 e as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13; e os linfócitos Th17 que expressam ROR $\gamma$ t e as citocinas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. As citocinas produzidas determinam o processo inflamatório que medeiam. Modernos perfis de citocinas e análise de fatores de transcrição levaram à classificação mais detalhada dos linfócitos T auxiliares, apontando mudanças para os perfis fenotípicos Th17, f-Th, Th9 e Th22 nas doenças periodontais (CHEN, 2015; MORETTI, 2015; KONG, 2015; LUO, 2014; ARAUJO-PIRES, 2014; ARUN, 2011) (Figura 3). Os linfócitos T efetores podem ser linfócitos T virgens, linfócitos T recentemente ativados, ou linfócitos T de memória que podem ser distinguidos por meio de marcadores de superfície celular (HALL, 2015).



Adaptado de CARBO, 2014

**Figura 03:** Heterogeneidade dos fenótipos de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

Estudos recentes têm demonstrado a participação da Interleucina-33 (IL-33) na patogênese da periodontite (KOSEOGLU et al., 2014; MALCOLM et al., 2015; DA LUZ et al., 2014; BUDUNELI et al., 2012; PAPATHANASIOU et al., 2014; BEKLEN et al., 2014). Esta citocina é descrita como membro da família da IL-1, expressa por muitos tipos de células após estimulação pró-inflamatória e participa de mecanismos de lise celular. Níveis aumentados de IL-33 secretados nos tecidos periodontais podem exacerbar a destruição periodontal por indução de RANKL (MALCOLM et al., 2015; KOSEOGLU et al., 2014), porém esta relação ainda não está totalmente estabelecida, uma vez que outros estudos não encontraram associação positiva entre os níveis de IL-33 nos tecidos periodontais e a periodontite (PAPATHANASIOU et al., 2014; BUDUNELI et al., 2012). Além disso, BEKLEN et al., (2014) levantaram a hipótese de que esta citocina pode ter um papel protetor por induzir um perfil Th2 predominante.

Recentemente, vários estudos também demonstraram uma estreita relação entre os níveis aumentados da interleucina-18 (IL-18) e a patogênese da periodontite crônica (CHITRAPRIYA, 2015; BANU, 2015; YOSHINAKA, 2014; SCHALLHORN, 2010; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, 2011; YEE, 2012). A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória potente com semelhanças estruturais com IL-1beta (HAMED, 2009). Na presença de IL-12, IL-18 induz respostas de Th1, enquanto, na ausência de IL-12, promove respostas Th2. Portanto, IL-18 tem a capacidade de induzir diferenciação Th1 ou Th2 (OROZCO, 2007).

Os linfócitos T também secretam citocinas pró-reabsortivas, como por exemplo, IL-1, IL-6 e IL-17, e cada uma estimula o receptor ativador do ligante de NFKB (RANKL) expresso em osteoblastos e fibroblastos, permitindo a formação osteoclástica por um processo dependente de contato. As células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17 são designadas como subpopulação Th17, que expressa TNF, IL-6 e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Estas células são respondedoras a IL-23, que por sua vez, irá regular a sua expansão e sobrevivência (GILLESPIE, 2007).

O microambiente da lesão periodontal também pode conter IL-10, que tem efeito em vários tipos celulares, incluindo células T, células B, macrófagos, células NK, mastócitos e neutrófilos. Estes efeitos incluem uma modulação negativa da produção de IL-1, IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$ , e inibição da fagocitose (MURRAY, D. A.; WILTON, J.M.A, 2003).

Células T regulatórias (Treg) (NAKAJIMA, 2005; CARDOSO, 2008) e células Th17 (OHYAMA et al, 2009; SCHENKEIN, 2010) têm sido demonstradas nos tecidos



periodontais, aumentando a importância destas na imunorregulação da doença periodontal. As implicações clínicas nesses estudos podem ser vistas na identificação da expressão gênica de citocinas Th1/Th2 e Treg/Th17 no sangue periférico e em transcriptomas salivares que agora estão sendo testados como possíveis marcadores de suscetibilidade à doença (OHLRICH, E.J.; CULLINAN, M.P.; SEYMOUR, G.J, 2009).

Normalmente, o repertório de células T contém linfócitos T regulatórios CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> que controlam as respostas imunes auto-reativas na periferia (KAWAHATA et al, 2002). A população de células T regulatórias CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> e possivelmente outras células T regulatórias são encontradas na doença periodontal e mostraram-se mais elevadas na periodontite quando comparadas com a gengivite (NAKAJIMA et al, 2005).

As células T regulatórias são responsáveis pelos mecanismos de tolerância e a função supressiva de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> mostrou ser em parte dependente do contato celular, sugerindo que a mucosa humana induz tolerância a diversos antígenos (KARLSSON et al, 2004).

## 2.2 DETERMINANTES ANTIGÊNICOS DE *Porphyromonas Gingivalis*

*Porphyromonas gingivalis*, é um bacilo Gram-negativo (G-) anaeróbio estrito, da família Bacteroidacea, de grande importância como agente etiológico da doença periodontal, principalmente em coinfeção com outras bactérias. Esta bactéria possui uma variedade de fatores de virulência tais como proteínas da cápsula, lipopolissacarídeo (LPS), fímbrias e proteínas da membrana externa, como as gingipaínas ligadas e secretadas, podendo determinar uma grande imunogenicidade, ao estimular mecanismo da imunidade inata e adaptativa, tanto na resposta imune humoral quanto na resposta imune celular do hospedeiro. Fatores de virulência como: Gingipaínas específicas para argininas (HRgpA e RgpB) e para lisinas (Kgp), Lipídeos A1- e 40, serina fosfatase (SerB), peptidil arginina deaminase, nucleosídeo difosfato cinase, fímbrias (FimA e Mfa1), Hemaglutinina possuem um papel relevante na infecção bacteriana, no início e progressão da periodontite (ZENOBIA, 2015).

Gingipaínas são proteases semelhantes à tripsina cisteína produzidas por *Porphyromonas gingivalis*. As atividades de virulência de gingipaínas contam com mecanismos de ativação e inativação de proteínas do hospedeiro, estimulando a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) em fibroblastos (TANCHAROEN, 2015; BENGTTSSON, 2015; POTEPA, 2003). As MMP são um grupo de enzimas zinco-dependentes responsáveis pela degradação da matriz extracelular durante a renovação

tecidual e também durante os processos inflamatórios. A expressão e atividade das MMPs em tecidos no adulto é normalmente baixa, mas aumenta significativamente em várias condições patológicas que podem levar à destruição dos tecidos, tais como doenças inflamatórias, crescimento tumoral e metástase. Estas enzimas podem clivar especificamente e degradar colágeno e matriz do tecido conjuntivo em pH e temperatura fisiológicos. Quando secretadas podem destruir os tecidos periodontais, degradando citocinas, componentes do sistema complemento e vários receptores, incluindo o CD14 em macrófagos, células T CD4 e CD8, perturbando os sistemas de defesa do hospedeiro, e assim facilitando a colonização por *P. gingivalis* (KUULA, 2009; DESARDA, 2013).

*Porphyromonas gingivalis* pode invadir localmente os tecidos periodontais e evadir os mecanismos de defesa do hospedeiro, utilizando um painel de fatores de virulência que desregulam as respostas imunes e inflamatórias inatas (BOSTANCI, 2012). Foi demonstrado que este patógeno possui a capacidade de invadir células epiteliais (NJOROGÉ et al., 1997), o que pode ser um mecanismo de escape contra as defesas do hospedeiro, favorecendo a penetração do microrganismo na corrente sanguínea e assim atuando sistemicamente em seu organismo (WALTER et al., 2004)

O LPS de *Porphyromonas gingivalis* é estruturalmente diferente do LPS das outras bactérias Gram negativas, possuindo também diferentes propriedades imunogênicas. É reconhecido pelas células inatas do hospedeiro pelo Toll-like receptor (TLR)-2 (HIRSCHFELD et al., 2001; COATS et al., 2003), podendo interagir com o TLR-2 e o TLR-6 (UNDERHILL; TIETZE et al., 2006). Este incomum padrão de reconhecimento depende da heterogeneidade estrutural do lipídio A (DARVEAU et al., 2004), que possibilitaria ligação tanto ao TLR-2 quanto ao TLR-4 em associação ao CD14. Além disso, uma lipoproteína associada ao LPS de *Porphyromonas gingivalis* (PG1828) identificada por Asai et al. (2005), parece estar extremamente envolvida na sinalização pelo TLR-2, e a remoção desse LPS pode reduzir acentuadamente o reconhecimento de *Porphyromonas gingivalis* por esta via.

A capacidade de *Porphyromonas gingivalis* evadir a resposta imunológica do hospedeiro e captar nutrientes no microambiente é diretamente relacionada com sua sobrevivência, proliferação e infecção, sendo o ferro um dos nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento. Este componente encontra-se em maior abundância no hospedeiro na forma de hemina (OLCZAK et al. 2005), que é um co-fator para o estoque de oxigênio, transporte de elétrons e bioquímica de oxirredução, essenciais para a sobrevivência da bactéria (WOJTOWICZ et al., 2009). Destarte, *Porphyromonas gingivalis* possui

mecanismos especiais que a capacitam a remover hemina de proteínas como a hemoglobina ligada à haptoglobina e hemina complexada à hemopexina (BRAMANTI; HOLT, 1993), utilizando a transferrina do soro e a lactoferrina localizada nas superfícies das mucosas para o seu crescimento (GENCO; ODUSANYA; BROWN, 1994; GENCO et al, 1995).

Na aquisição de ferro e hemina, *Porphyromonas gingivalis* faz uso de hemaglutininas, proteases (principalmente gingipaínas), lipoproteínas e receptores específicos da membrana externa (NELSON et al., 2003; POTEPA et al., 2003; OLCZAK et al., 2005). Estudos têm demonstrado que gingipaínas específicas para lisina e arginina (Kgp e Rgp, respectivamente) podem ligar-se e, subsequentemente, clivar hemoglobina (IMAMURA, 2003), promovendo a degradação da trombomodulina vascular endotelial (INOMATA et al., 2009).

A caracterização de um gene estrutural para um novo receptor de membrana externa dependente de TonB (HmuR), necessário para a captura e utilização de hemoglobina e hemina por *P. gingivalis*, foi relatada por Simpson, Olczak e Genco (2000). Sua inativação resultou na diminuição da capacidade da bactéria em ligar hemoglobina e crescer em um ambiente com hemoglobina ou hemina como única fonte de ferro (SIMPSON; OLCZAK; GENCO, 2000, 2004; OLCZAK; DIXON; GENCO, 2001; LEWIS et al, 2006; OLCZAK; SIUDEJA; OLCZAK, 2006). O gene hmuR está localizado em um operon com um gene hmuY nas cepas de *Porphyromonas gingivalis* A7436 (SIMPSON; OLCZAK; GENCO, 2000) e W83 (LEWIS et al, 2006).

HmuY é um peptídeo de 24 kDa ligante de hemina associado à membrana. Pode estar funcional sob a forma de dímeros ou oligômeros e a sua estrutura amino-terminal (OLCZAK et al., 2008) é idêntica ao Fator Ativador de Fibroblastos (FAF), anteriormente identificado nas cepas de *Porphyromonas gingivalis* W50, W83 e ATCC33277 (MIHARA; YONEDA; HOLT, 1993a,b), que exerce uma fraca atividade fosfatase, podendo estar envolvida na reabsorção óssea, além de induzir proliferação de fibroblastos e ser funcionalmente similar com outros fatores de crescimento humanos. De acordo com Olczak et al. (2008), HmuY pode ser o primeiro membro relatado de uma classe de proteínas em *Porphyromonas gingivalis* e espécies de *Bacteroides* envolvidas na utilização de hemina, cuja função é seqüestrá-la e entregá-la ao seu transportador de membrana cognato, o HmuR (OLCZAK; SIUDEJA; OLCZAK, 2006; WÓJTOWICZ et al, 2009). Tanto HmuY quanto HmuR parecem ser essenciais para o crescimento e sobrevivência de *Porphyromonas gingivalis*, uma vez que mutantes da cepa A7436

denominados T01 (com deleção no gene *hmuY* e inserção do gene *tetQ*, que confere resistência à tetraciclina), T02 (com deleção dos genes *hmuY* e *hmuR* e inserção dos genes *tetQ* e *ermF*, que confere resistência à eritromicina), T03 e T04 (com deleção in-frame de uma região interna do gene *hmuY* de 300pb e inserção do gene *ermF* nas posições senso e anti-senso), respectivamente apresentaram defeitos no crescimento quando hemina e hemoglobina foram utilizadas como fonte única de ferro (OLCZAK et al. 2008).

A proteína HmuY é altamente abundante na superfície externa da célula, em membranas externas de vesículas e é liberada em cultura na forma solúvel. HmuY está presente constitutivamente em baixos níveis em culturas bacterianas desenvolvidas sob altas condições de hemina/ferro; sob baixas condições de hemina/ferro, características do biofilme dental, a proteína é produzida em altos níveis. Ela desempenha um papel significativo não somente na aquisição da hemina, mas também na formação do biofilme dental. Tem-se sugerido que a proteína na superfície celular poderia ser reconhecida pelo sistema imunológico do hospedeiro durante a periodontite crônica e que a produção de anticorpos anti-HmuY poderia inibir a formação do biofilme (Olczak et al., 2010).

Estudos recentes demonstraram uma sintropia entre diferentes espécies bacterianas do biofilme oral através da cooperação mútua para a aquisição de nutrientes. Este mecanismo revela como HmuY trabalha em conjunto com uma protease cisteína, *Interpain A (InpA)* de *Prevotella intermedia*, para adquirir o heme da hemoglobina e pode representar mutualismo entre *P. gingivalis* e *P. Intermedia* co-habitando a bolsa periodontal. HmuY e as proteases gingipáinas de *Porphyromonas gingivalis* formam um sistema sintrópico único responsável pela captura do heme da hemoglobina e metahemalbumina. HmuY é resistente à proteólise e assim capaz de cooperar com *InpA* de *P. Intermedia* para extrair o heme da hemoglobina, previamente convertida proteoliticamente em meta-hemoglobina. (BYRNE, 2013).

Além disso, existe uma associação íntima entre *P. gingivalis* e *T. denticola*, já que estas bactérias, em cultura polimicrobiana com *Tannerella forsythia*, parecem se associar e dominar o biofilme (ZAINAL-ABIDIN et al 2012). Esta interação acarreta numa mudança de estratégia na aquisição de ferro por *P. gingivalis*, favorecendo o aumento de *HusA* (“*Heme uptake system protein A*”) e *HusB* (“*Heme uptake system protein B*”), que são proteínas de ligação ao heme, enquanto HmuY e outros sistemas de transporte de ferro/heme diminuem.

O estudo de SMIGA et al (2015) demonstrou, em coelhos imunizados com HmuY e seus homólogos provenientes de *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythia*, que os anticorpos dirigidos contra HmuY de *P. gingivalis* são altamente específicos para a proteína purificada e para HmuY ligado a células de *P. gingivalis*. Não foi detectada nenhuma reatividade entre *P. intermedia* e *T. Forsythia* ou entre os homólogos purificado a partir destas bactérias e anticorpos anti-HmuY, sugerindo que a proteína HmuY de *P. gingivalis* pode servir como um antígeno específico para a determinação de anticorpos séricos dirigidos contra esta bactéria.

O potencial imunogênico de HmuY de *Porphyromonas gingivalis*, vem sendo demonstrado, observando-se a sua capacidade de promover o processo inflamatório, induzindo altos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6 (TRINDADE et al, 2012; TRINDADE et al, 2013). Além disso, HmuY parece participar de uma resposta mais tardia com o aumento nos níveis de IL-10, IgG e IgG1 anti-HmuY e inibição da produção de IL-8 em pacientes com periodontite crônica (TRINDADE et al, 2012), e alta produção de IL-6 (TRINDADE et al, 2013).

Apesar de seu potencial de virulência, o papel da proteína HmuY na estimulação da resposta imune ainda não está bem estabelecido.

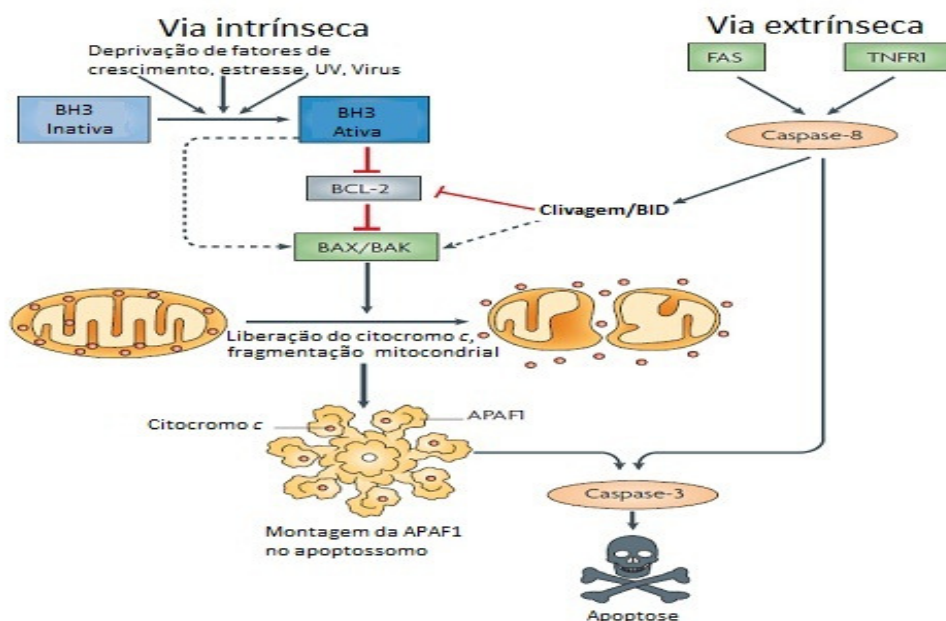
### 2.3 PERIODONTITE CRÔNICA E MORTE CELULAR

A morte celular pode ser discutida e caracterizada em dois aspectos principais: apoptose e necrose. A apoptose pode ser descrita como um processo autônomo, ativo e programado de morte celular que não induz inflamação; já a necrose pode ser entendida como uma morte celular passiva, acidental, podendo resultar de estímulos ambientais, com liberação descontrolada de conteúdos celulares inflamatórios (FINK; COOKSON, 2005). No entanto, podem ser classificados outros tipos de morte celular, podendo ou não resultar em liberação de conteúdo inflamatório. Os quatro tipos mais descritos incluem: apoptose, autofagia, oncoses e piroptose. Apoptose é a via de morte celular iniciada pelas caspases iniciadoras, que ativam as caspases efetoras para clivarem substratos celulares (SAMALI et al., 1999).

As células apoptóticas apresentam condensação citoplasmática e nuclear (KERR; WYLLIE; CURRIET, 1972), dano no DNA, formação de corpos apoptóticos, manutenção da membrana plasmática intacta, porém com exposição de moléculas de superfície para a fagocitose dos corpos apoptóticos intactos (LAUBER et al., 2003; SAVILL; FADOK, 2003). Uma destas moléculas é a fosfatidilserina (MARTIN et al.,

1996), que é encontrada no interior da membrana plasmática e que no curso da apoptose, pode ser exposta na superfície da célula, podendo ser usada como ferramenta na avaliação de morte celular, devido à sua afinidade com a anexina V (VAN ENGELAND et al., 1998). Na ausência de fagocitose, os corpos apoptóticos podem se romper, levando a apoptose tardia ou necrose apoptótica.

A apoptose pode ser induzida por receptores de superfície celular, tais como Fas e receptores do factor de necrose tumoral-1 (TNFR1) (via extrínseca) ou por vários agentes genotóxicos, insultos metabólicos ou sequências transcricionais (via intrínseca). A via intrínseca começa com a indução de proteínas que apresentam apenas o domínio BH3 ou com ativação pós-translacional, o que resulta na inativação de alguns membros da família Bcl-2, promovendo a ativação de Bax e Bak, que por sua vez, promove a apoptose. Algumas proteínas BH3, como Bim e Puma, também podem ser capazes de ativar Bax e / ou Bak. Uma vez ativadas, Bax e Bak promovem a liberação do Citocromo c e provocam a fissão mitocondrial, que leva à ativação de APAF1 no apoptossomo, ativando a caspase-9 para ativar a caspase-3. Caspases, por sua vez clivam uma série de substratos, ativando DNases e orquestrando a destruição da célula. A via extrínseca pode ignorar a etapa mitocondrial e ativar diretamente a caspase-8, que leva à ativação da caspase-3 e destruição celular. A família Bcl-2 regula a via intrínseca e pode modular a via extrínseca quando a clivagem do BID se comunica entre as duas vias (YOULE; STRASSER, 2008) (Figura 4)



Adaptado de YOULE; STRASSER, 2008

**Figura 04:** Esquema representando as vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose.

Estudos têm demonstrado diversos fatores de supressão ou de inibição de apoptose, demonstrando a dependência de genes que codificam proteínas anti e pró-apoptóticas no equilíbrio desse processo (URNOWEY et al., 2006). Pode-se observar danos no DNA associados a apoptose e expressão de p53 e Bcl-2 (TONETTI; CORTELINNI; LANG, 1998), Fas, Fas ligante e caspase-3 ativa em tecidos gengivais, quando há um desafio crônico bacteriano (BASCONES et al., 2004). Segundo BROZOVIC et al. (2006), pode ser observada a indução de apoptose por *P. gingivalis* em células epiteliais gengivais humanas pelo aumento da expressão de FasL e da transcrição de genes mediada pelo fator nuclear ativador da cadeia leve kappa de células B ativadas (NFkB). Gingipainas de *Porphyromonas gingivalis* podem induzir apoptose tanto pela via dependente (URNOWEY et al., 2006) quanto pela via independente de caspase (SHEETS et al., 2006). A presença de apoptose em células T específicas para *Porphyromonas gingivalis* foi observada por GEMMELL et al. (1999), com a constatação morfológica de condensação e marginação nuclear durante 72 horas de cultivo.

Pode-se observar que o processo de supressão da resposta apoptótica de linfócitos T por fibroblastos gengivais em co-cultura pode ser induzida com ácido butírico, possivelmente pela produção de IL-6 e IL-11, onde os neutrófilos parecem resgatar células epiteliais da apoptose (GALICIA et al., 2009). Moléculas inibidoras de morte celular chamadas PD-1 (FIGUEIRA et al., 2009), receptores do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) e de inibidores de caspase-3 (LUCAS et al., 2010) estão presentes em lesões periodontais crônicas e podem estar envolvidas na inibição de apoptose. Segundo YAO et al. (2010), a indução de um fenótipo pró- sobrevivência pode impedir a morte programada da célula hospedeira e ajudar na sobrevivência da *P. gingivalis* dentro das células epiteliais. Este mecanismo pelo qual *P. gingivalis* pode bloquear as vias de apoptose ocorre através da manipulação da via JAK/Stat que controla as vias intrínsecas mitocondriais de morte nas células. Em um outro estudo, YILMAZ et al. (2008) demonstraram que *P. gingivalis*, pode inibir a apoptose de células epiteliais gengivais pela ligação de ATP à receptores P2X. E que um homólogo da molécula nucleosídeo difosfato quinase (NDK) de *P. gingivalis*, promove a sobrevivência de células do hospedeiro por hidrólise de ATP extracelular e prevenção de apoptose através de P2X.

O LPS de *Porphyromonas gingivalis* também pode prevenir neutrófilos HL60 de apoptose. Entretanto, este processo pode ser restaurado com a adição de IL-10, o que pode

explicar o mecanismo para o desenvolvimento da inflamação periodontal destrutiva (MURRAY; WILTON, 2003).

A proteína HmuY de *Porphyromonas gingivalis* também parece atuar no processo de morte celular programada. As CMSP em contato com a proteína em cultura parecem ser incapazes de completar o processo de apoptose, resultando em mortes caracterizadas por liberação de conteúdo celular inflamatório no microambiente, como a apoptose tardia e a necrose, o que pode prolongar o processo de destruição tecidual (TRINDADE et al., 2012). Além disso, a proteína induz altos níveis de Bcl-2 em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de indivíduos com periodontite crônica, resultando em inibição da apoptose por permitir a maior sobrevivência de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, o que prolongaria o quadro inflamatório crônico na periodontite (CARVALHO-FILHO et al., 2013).



### **3 -HIPÓTESES**

H1 - Existem diferenças no perfil de produção de citocinas e expressão de mRNA nas CMSP de indivíduos com periodontite crônica em comparação com aqueles sem periodontite.

H0 - Não existem diferenças no perfil de produção de citocinas e expressão de mRNA nas CMSP de indivíduos com periodontite crônica em comparação com aqueles sem periodontite.

## 4 - OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a produção de citocinas e o perfil de expressão gênica em cultura de Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP) de indivíduos com periodontite crônica, frente à proteína recombinante HmuY (rHmuY) de *Porphyromonas gingivalis* (Pg).

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os níveis de produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 e IL-18 nos sobrenadantes de cultura de CMSP de indivíduos portadores de periodontite crônica sob estímulo de rHmuY de Pg.
- Verificar a expressão de mRNA de genes relacionados à apoptose em cultura de CMSP de indivíduos portadores de periodontite crônica sob estímulo de rHmuY de Pg.
- Caracterizar a expressão dos genes HSPA4, HSPD1 e HSP90B1 por CMSP de indivíduos portadores de periodontite crônica sob estímulo de rHmuY de Pg.
- Demonstrar a participação de genes que codificam citocinas, quimiocinas e receptores em CMSP de indivíduos do grupo PC sob estímulo de rHmuY
- Compreender a participação de genes que codificam fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória em CMSP de indivíduos do grupo PC sob estímulo de rHmuY

## 5-METODOLOGIA

### 5.1 DESENHO DE ESTUDO E TAMANHO DA AMOSTRA

Para a avaliação da expressão gênica, induzida por rHmuY de *Porphyromonas gingivalis*, de moléculas responsáveis pelos mecanismos de apoptose, reposta de células T, inflamação e receptores de citocinas na doença periodontal, foi proposto um estudo experimental em que células de indivíduos com periodontite crônica e de indivíduos sem periodontite foram estimuladas com antígenos da bactéria.

O tamanho mínimo da amostra para o presente estudo foi calculado com base nos níveis de IL-10 observados na população em estudo (TRINDADE et al., 2012a). Foram considerados um desvio-padrão de 200pg/mL e uma diferença mínima a ser detectada de 180pg/mL, empregado-se um nível de significância de 5% e poder do teste 80%. Desta forma o número calculado de participantes em cada grupo foi de 19 indivíduos, para um teste bicaudal.

### 5.2. SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

Para a avaliação da indução de mecanismos de apoptose, reposta de células T, inflamação e receptores de citocinas por rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* na doença periodontal, foi proposto um estudo com 40 voluntários, com idades acima de 18 anos e de ambos os sexos.

Os participantes do estudo foram examinados de acordo com os descritores clínicos periodontais e aqueles que apresentaram 4 ou mais dentes com um ou mais sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 4mm, com perda de inserção clínica maior ou igual a 3mm no mesmo sítio e presença de sangramento ao estímulo compuseram o grupo teste (GOMES FILHO et al. 2005).

Os critérios de exclusão avaliados pela anamnese (Apêndice 01) e considerados para este estudo foram: Diabetes, hipertensão, doenças auto-imunes, doenças reumáticas, gestação atual, tratamento periodontal anterior, tabagismo atual ou anterior, uso de antibióticos e antiinflamatórios, respectivamente, nos três 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 (Apêndice 03), permanecendo uma cópia com os mesmos.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO PERIODONTAL

A avaliação da condição periodontal foi realizada por um único examinador devidamente calibrado (P.C.C.F.) (Coeficiente Kappa para concordância intra-examinador = 0,932) utilizando como referência os descritores clínicos periodontais propostos por GOMES-FILHO et al., 2007. O registro foi feito na ficha de exame bucal formulada para o presente estudo (Apêndice 03).

#### 5.3.1 DESCRITORES CLÍNICOS

- EXAME DE PROFUNDIDADE DE SONDAGEM DE SULCO/BOLSA

A profundidade de sondagem de sulco foi registrada em 6 locais para cada dente, conforme descrito por PIHLSTROM et al., 1981, e consiste em quatro medidas proximais (referente aos ângulos méso-vestibular, méso-lingual, disto-vestibular e disto-lingual), uma medida na região médio-vestibular e uma medida na região médio-lingual.

Todas as medidas foram feitas com sonda milimetrada do tipo Williams (TRINITY, SP) e as mesmas sondas foram usadas durante toda a investigação. A profundidade de sondagem de sulco/bolsa foi registrada em cada local significando a distância da margem gengival à extensão mais apical de penetração da sonda.

Os procedimentos de sondagem de sulco/bolsa sempre foram executados pelo mesmo operador, colocando-se a sonda delicadamente no sulco gengival de cada face, previamente seca com gaze estéril, até encontrar uma resistência tecidual mínima à penetração. Neste momento, com a sonda colocada na posição mais paralela possível ao longo eixo axial do dente, foi observada a marcação mais próxima da margem gengival, e então esta medida, em milímetros, foi anotada pelo auxiliar em ficha própria (Apêndice 02). Nos casos em que a margem gengival estava localizada entre duas marcas da sonda, adotou-se o valor inteiro da marca mais próxima e, se a margem ficou a uma posição equidistante de duas marcas, foi considerada a maior.

- ÍNDICE DE RECESSÃO OU HIPERPLASIA

As medidas da altura da margem gengival em relação à junção cimento-esmalte foram registradas em 6 locais para cada dente (sítios méso-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, méso-lingual, médio-lingual e disto-lingual), com as mesmas sondas milimetradas utilizadas para a obtenção da profundidade de sondagem de sulco/bolsa. No caso de recessão gengival, o valor em milímetros foi considerado positivo quando margem gengival se localizou apicalmente à junção cimento-esmalte. No caso de uma

hiperplasia gengival, o valor em milímetros foi considerado negativo quando a margem gengival se localizou coronalmente à junção cimento-esmalte.

Com a sonda milimetrada paralela ao longo eixo do dente e as superfícies dentárias secas com gaze estéril, uma seqüência foi estabelecida como já descrito no item anterior, assim como os procedimentos de aproximação numérica quando a junção cimento-esmalte estava localizada entre as marcas da sonda.

Estas medidas foram obtidas com o posicionamento da ponta da sonda na margem gengival e o valor, em milímetros, a partir deste ponto até a junção cimento-esmalte, foi imediatamente anotado na ficha de exame bucal (Apêndice 02).

- **NÍVEL DE INSERÇÃO CLÍNICA**

A medida de inserção clínica (RAMFJORD, 1959) foi obtida através da somatória dos valores da profundidade de sondagem de sulco/bolsa e medidas de recessão ou hiperplasia gengivais. No caso de uma recessão, o nível de inserção clínica foi a soma dos valores de profundidade de bolsa e da medida de recessão. No caso de uma hiperplasia gengival, foi a somatória do valor positivo da profundidade de bolsa com o valor negativo dado à hiperplasia, ou seja, na prática representou a subtração do valor da hiperplasia daquele atribuído à profundidade de sondagem de bolsa. Finalmente, seis medidas de nível de inserção clínica foram obtidas: méso- vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, médio-lingual e méso-lingual.

- **ÍNDICE DE SANGRAMENTO À SONDAGEM**

Um dos parâmetros que foi utilizado para avaliar a condição gengival foi o índice de sangramento (AINAMO; BAY, 1976) usando o critério da presença de sangramento após a sondagem. Os tecidos periodontais inflamados, portanto, não saudáveis, tendem ao sangramento quando da introdução de uma sonda que atinge o tecido conjuntivo devido à presença de microulcerações no epitélio (HEBLING, 2003).

Aproveitando a oportunidade da obtenção dos registros de profundidade de sondagem de sulco/bolsa e após a secagem das superfícies dentárias e medição da profundidade de sondagem de sulco/bolsa, observou-se depois de passados 10 segundos a presença ou não de sangramento após a remoção da sonda milimetrada da bolsa ou sulco. Quando foi observado sangramento subsequente à sondagem em determinada face, o registro foi feito na ficha (Apêndice 03). A proporção de faces sangrantes em relação

ao total de faces examinadas foi calculada, determinando assim o índice de sangramento para cada indivíduo.

#### 5.4 PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO

##### 5.4.1 OBTENÇÃO DE HmuY DE *P. gingivalis*

O polipeptídeo HmuY de *P. gingivalis* sem os primeiros 25 resíduos de aminoácidos (NCBI accession no. CAM 31898) foi sobre-expresso usando o plasmídeo pHmuY11 em células de *Escherichia coli* ER2566 (New England Biolabs, MA, EUA), posteriormente purificado a partir de uma fração solúvel de *E. coli* lisada como anteriormente descrito (Olczak, 2010). Endotoxinas contaminantes foram removidos das amostras de HmuY utilizando Colunas de remoção de endotoxina Detoxi-Gel (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). O peptídeo foi gentilmente cedido por Profa. Dra. Teresa Olczak do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Biotecnologia da Universidade de Wroclaw, Polônia. HmuY foi preparada para utilização na concentração final de 2.5µg/mL.

#### 5.5 COLETA DE SANGUE

O sangue dos indivíduos foi coletado num volume de 20mL, por punção venosa na fossa ante-cubital com tubo à vácuo estéril (BD-SP) com Heparina.

#### 5.6 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP) E CULTURA CELULAR

As células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas de amostras de sangue periférico e purificadas por centrifugação em gradiente de densidade utilizando ficoll- hipaque de acordo com instrução do fabricante (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Todas as células foram lavadas duas vezes em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (LGCBio, São Paulo, SP, Brazil) e as CMSP foram cultivadas em placas de 24 poços (106 células/poço) em RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (proteínas do complemento inativadas por calor) e 1% de solução com antibiótico/antimicótico (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Todas as culturas cresceram por 48 horas à 37°C sob 5% de CO<sub>2</sub> em condições de umidade. As células foram incubadas com 5 pg/mL do mitógeno pokeweed (PWM) como controle positivo, 2,5 pg/mL de HmuY, ou na ausência de antígenos (células). Após a cultura, as células e os sobrenadantes foram criopreservados em freezer -70°C para uso posterior.

### 5.7 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO ELISA PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS

As concentrações das citocinas IL-1p, IL-4, IL-10 e IL-18 nos sobrenadantes das culturas de células foram mensuradas usando-se kits disponíveis comercialmente DuoSet ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Os ensaios foram realizados usando-se placas de poliestireno de alta adsorção com 96 poços de fundo chato (Costar, Corning Life Science, Lowell, MA, USA). As amostras foram diluídas conforme padronização prévia em diluente de reagente recomendado pelo fabricante e todas as demais etapas foram realizadas também de acordo com as instruções do fabricante. A densidade ótica foi determinada em Leitora de ELISA (ELx 800 - Bio- Tek) ajustada para um comprimento de onda na faixa de 450 nm

### 5.8 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

RNA total foi extraído de todas as amostras da cultura de CMSP. Para extração de RNA foi utilizado o RNeasy Mini Kit da QIAGEN (número de catálogo: 74104). O RNA obtido foi imediatamente convertido em cDNA (DNA complementar).

A partir de 1 µg de RNA total foi confeccionada a fita de cDNA por transcrição reversa (RT<sup>2</sup> First Strand Kit - SABioscience (cod. C03)). Inicialmente foram adicionados à amostra de RNA, 2µl do GE (5X gDNA Elimination Buffer) e o volume final da reação foi ajustado para 10µl com água livre de RNase. A amostra foi submetida ao termociclador (QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System 384-well block (Applied Biosystems)) a 42°C durante 15 minutos e imediatamente após esse período foi adicionado a essa amostra um coquetel, previamente preparado, contendo: 4µl do tampão BC3 (5X RT Buffer 3), 1µl do P2 (Primer and External Control Mix), 2µl do RE3 (RT Enzyme Mix 3) e 3 µl de água livre de RNase, que foi aquecida a 95°C por 5 minutos. Ao final desta reação o cDNA foi diluído com 91µl de água e estocado a -20°C até o momento do uso.

### 5.9 TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (CUSTOM HUMAN RT<sup>2</sup> PROFILER™ PCR ARRAY)

Para a análise da expressão gênica foi utilizado um sistema de PCR em tempo real (ABI QuantStudio 384-well block). Este arranjo permitiu a análise simultânea de 42 genes envolvidos em mecanismos de apoptose, reposta de células T, inflamação e receptores celulares. Além dos genes de interesse, as placas contêm 03 controles

endógenos que garantem sensibilidade, especificidade e alta reprodutibilidade dos resultados. Foram utilizadas 05 placas para o arranjo com genes relacionados à apoptose, proteínas de choque térmico, citocinas, quimiocinas, receptores e fatores de transcrição em humanos. Os genes avaliados estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1.** Genes selecionados para o arranjo de PCR em tempo real

	<b>SIMBOLO</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
<b>APOPTOSE</b>	BAD	BCL2-associated agonist of cell death
	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1
	BAX	BCL2-associated X protein
	BID	BH3 interacting domain death agonist
	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
	BCL2L1	BCL2-like 1
	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
	CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
	FAS LG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1	
<b>PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO</b>	HSPA4	Heat shock 70kDa protein 4
	HSP90B1	Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1
	HSPD1	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)
<b>CITOCINAS, QUIMIOCINAS E RECEPTORES</b>	IFNG	Interferon, gamma
	TNF	Tumor necrosis factor
	IL1B	Interleukin 1, beta
	IL2	Interleukin 2
	IL4	Interleukin 4
	IL5	Interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
	IL13	Interleukin 13
	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
	IL8	Interleukin 8
	IL10	Interleukin 10
	IL12A	Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)
	IL17A	Interleukin 17A
	IL17F	Interleukin 17F
	IL21	Interleukin 21
IL23A	Interleukin 23, alpha subunit p19	



	IL18	Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)
	IL33	Interleukin 33
	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
<b>FATORES DE TRANSCRIÇÃO E INIBIDOR DE TRANSCRIÇÃO</b>	RORC	RAR-related orphan receptor C
	F0XP3	Forkhead box P3
	GATA3	GATA binding protein 3
	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
	NFKBIL1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1
<b>HOUSEKEEPING GENES</b>	GUSB	Glucuronidase, beta
	ACTB	Actin, beta
	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

As reações foram realizadas para cada amostra de cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído das CMSP humanas. Estas foram agrupadas em 04 grupos contendo 08 amostras em cada, 02 grupos sem estimulação antigênica e 02 grupos estimulados com rHmuY de *Porphyromonas gingivalis*. Após a separação dos grupos pelo critério clínico proposto por GOMES-FILHO et al, 2007, o grupo PC para o ensaio de expressão gênica foi escolhido em função da maior gravidade da doença. Estes participantes foram classificados com periodontite grave se tivessem, pelo menos, 2 sítios interproximais com perda de inserção clínica maior ou igual a 6 mm (não afetando o mesmo dente) e, pelo menos, um sítio interproximal com profundidade de sondagem maior ou igual a 5 mm (PAGE & EKE, 2007; EKE et al. 2012) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distribuição das amostras para PCR em tempo real.

<b>Sem Estímulo (B)</b>		<b>rHmuY (HmuY)</b>	
Amostra 01 (SP 01)	Amostra 09 (PC 09)	Amostra 01 (SP 01)	Amostra 09 (PC 09)
Amostra 02 (SP 02)	Amostra 10 (PC 10)	Amostra 02 (SP 02)	Amostra 10 (PC 10)
Amostra 03 (SP 03)	Amostra 11 (PC 11)	Amostra 03 (SP 03)	Amostra 11 (PC 11)
Amostra 04 (SP 04)	Amostra 12 (PC 12)	Amostra 04 (SP 04)	Amostra 12 (PC 12)
Amostra 05 (SP 05)	Amostra 13 (PC 13)	Amostra 05 (SP 05)	Amostra 13 (PC 13)

Amostra 06 (SP 06)	Amostra 14 (PC 14)	Amostra 06 (SP 06)	Amostra 14 (PC 14)
Amostra 07 (SP 07)	Amostra 15 (PC 15)	Amostra 07 (SP 07)	Amostra 15 (PC 15)
Amostra 08 (SP 08)	Amostra 16 (PC 16)	Amostra 08 (SP 08)	Amostra 16 (PC 16)

\*SP- mRNA proveniente das CMSP de indivíduos sem periodontite crônica

\*PC- mRNA proveniente das CMSP de indivíduos com periodontite crônica

Foi utilizado para cada arranjo customizado da PCR em tempo real: 1350  $\mu$ l do tampão; 102  $\mu$ l de reação de síntese de cDNA diluído; 1248  $\mu$ l de água livre de RNase. Foram adicionados 25  $\mu$ l desta mistura em cada poço da placa (2X SuperArray RT2 qPCR Master Mix (SyberGreen)) 384 poços já contendo pares de primers liofilizados para genes da via inflamatória, mecanismos de apoptose e citocinas (RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array: CAPH12794 - Custom Human RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array). Em seguida, a reação foi executada em um termociclador para PCR em tempo real (ABI QuantStudio 384-well block). Os tempos e temperaturas utilizados na amplificação dos genes estão descritos na tabela 3.

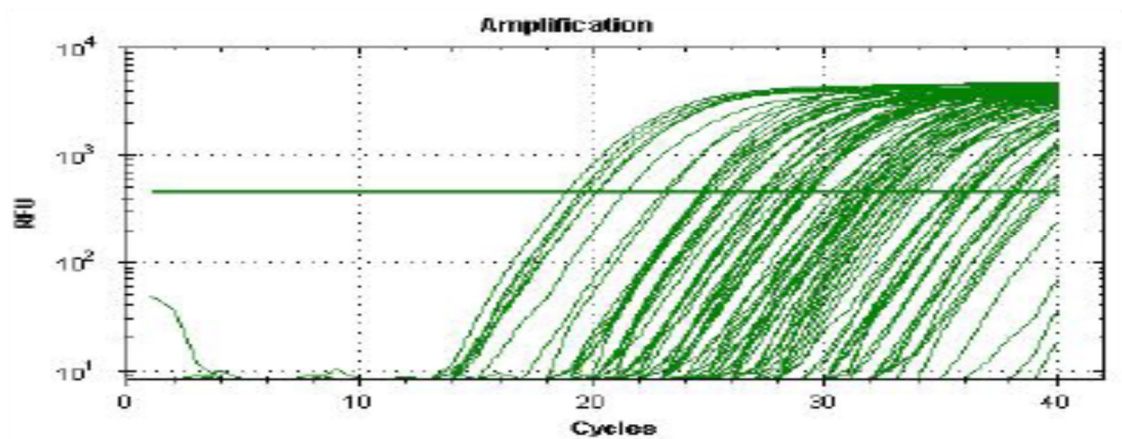
**Tabela 3** - Programa do termociclador utilizado na análise da expressão gênica.

	Ciclos	Duração	Temperatura
	1	10 minutos	95°C
Applied Biosystems™ QuantStudio™ 12K Flex		15 segundos	95°C
Real-Time PCR System 384-well block	40	30 a 40 segundos	55°C
		30 segundos	72°C

Applied Biosystems™ QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System 384-well block = nome do termociclador utilizado; Ciclos= quantidade de ciclos realizados; Duração=tempo decorrido em cada ciclo; Temperatura= temperatura alcançada durante o ciclo.

Após a amplificação das amostras (Figura 5), os cálculos da expressão diferencial foram realizados por um programa específico de análise de dados online (RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis SuperArray - SABiosciences). Os genes que apresentaram valores de ciclo threshold (Ct) acima de 35 foram considerados não expressos. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$

(Livak et al., 2001). Desta forma os dados foram representados como diferença (fold regulation) na expressão gênica. O software identificou GUSB (Beta Glucoronidase) como o gene referência mais estavelmente expresso para normalização dos dados.



**Figura 05:** Exemplo de curva de amplificação dos genes por PCR Array

## 5.10 ANÁLISE DOS DADOS

Para a expressão gênica, as análises estatísticas foram feitas utilizando um software online de análise de dados (RT<sup>2</sup> 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  $p < 0,05$ .

Os dados relativos à produção de citocinas por ELISA detectadas nos grupo SP e PC foram analisados por meio do teste não-paramétrico de Mann Whitney. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significante. Foram considerados com tendência de significância estatística os valores  $0,05 < p < 0,1$ .

## 6-RESULTADOS

Foram convidados a participar do presente estudo cerca de 750 indivíduos. Retirando-se os que se recusaram e os que não atenderam aos rigorosos critérios de não inclusão, 46 foram incluídos no estudo. O grupo com periodontite crônica (PC) foi composto por 20 participantes (43,5%), enquanto que o grupo sem periodontite (SP) foi composto por 26 participantes (56,5%). A média de idade dos participantes do grupo PC foi de 41,95 anos  $\pm$  9,7 anos, com limite mínimo de 18 anos e máximo de 56 anos. Já a média de idade das participantes do SP foi de 37,92 anos  $\pm$  10,8 anos, com limites mínimo e máximo de 22 anos e 57 anos, respectivamente. Com relação ao sexo dos voluntários, entre os participantes do grupo PC, 13 (65%) eram do sexo feminino e 7 (35%) eram do sexo masculino. Já no grupo SP, 17 (65,4%) eram do sexo feminino e 9 (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 covariáveis (Tabela 4).

**Tabela 4** – Achados Clínicos em indivíduos com periodontite crônica (PC) e sem periodontite (SP)

	GRUPO SP N=26	GRUPO PC N=20	p*
<b>Idade (anos)</b> <b>(média<math>\pm</math> DP)</b>	37,92 $\pm$ 10,8	41,95 $\pm$ 9,7	0,565
<b>Sexo</b> <b>(feminino/masculino)</b>	17/9	13/7	0,958
<b>% sítios com SS</b> <b>(média<math>\pm</math> DP)</b>	8,45 $\pm$ 10,7	37,97 $\pm$ 16,9	0,028
<b>% sítios com PS<math>\geq</math>4mm</b> <b>(média<math>\pm</math> DP)</b>	1,23 $\pm$ 1,84	14,93 $\pm$ 8,91	0,000
<b>% sítios com NIC<math>\geq</math>3mm</b> <b>(média<math>\pm</math> DP)</b>	19,60 $\pm$ 15,53	57,04 $\pm$ 17,25	0,000

<b>%</b>	<b>sítios</b>	<b>com</b>	2,45 ±6,19	14,28 ±13,93	0,000
<b>NIC≥5mm</b>					
<b>(média± DP)</b>					

\* Valor de p: nível de significância  $\leq 0,05$

No que se refere aos aspectos relacionados à condição periodontal, como já era esperado, houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em todos os descritores clínicos avaliados. Ainda na tabela 3 observa-se que o grupo PC apresentou um percentual médio de sítios com sangramento à sondagem de 37,97 enquanto que o valor para o grupo SP foi de 8,45 ( $p=0,028$ ); o percentual médio de sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 4mm foi significativamente superior ( $p=0,000$ ) no grupo PC (14,97%) quando comparado ao grupo SP (1,23%). Com relação ao nível de inserção clínica, o grupo PC apresentou percentuais médios de NIC maior ou igual a 3mm ( $p=0,000$ ) e NIC maior ou igual a 5mm ( $p=0,000$ ) de 57,04 e 14,28, respectivamente, enquanto os percentuais para o grupo SP foram de 19,6 e 2,45, respectivamente.

## 6.1 - PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CMSP

Os níveis das citocinas interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-18 (IL-18) produzidos pelas CMSP foram dosados por ELISA e as diferenças entre os grupos foram analisadas de acordo com o estímulo utilizado durante a cultura.

### 6.1.2 - IL-1 $\beta$

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos níveis de IL-1 $\beta$  entre os grupos PC e SP quando as células foram cultivadas sem estímulo ( $p=0,506$ ), em presença do mitógeno Pokeweed ( $p=0,319$ ) ou da proteína rHmuY ( $p=0,973$ ) (Gráfico 1A).

### 6.1.3 - IL-4

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos níveis de IL-4 entre os grupos PC e SP quando as células foram cultivadas sem estímulo ( $p=0,168$ ), em

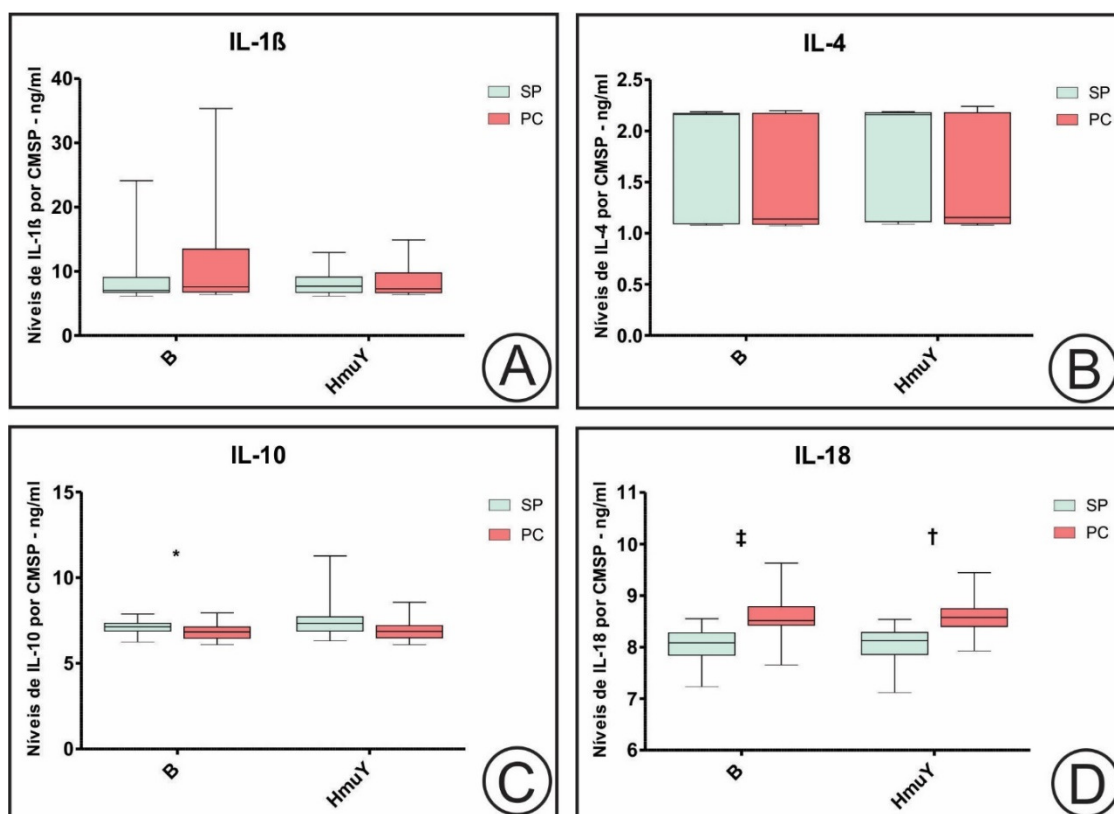
presença do mitógeno Pokeweed ( $p=0,325$ ) ou da proteína rHmuY ( $p=0,096$ ) (Gráfico 1B).

#### 6.1.4 - IL-10

Foram observados menores níveis de IL-10 secretados por CMSP de indivíduos do grupo PC em comparação com os níveis produzidos por células de indivíduos do grupo SP, quando as células foram cultivadas sem estímulo (B) ( $p=0,034$ ). Entretanto, em presença do mitógeno pokeweed ( $p=0,184$ ) ou da proteína rHmuY ( $p=0,051$ ) não foram observadas diferenças significantes entre os grupos (Gráfico 1C).

#### 6.1.5 - IL-18

Foram observados níveis mais altos de IL-18 em CMSP de indivíduos do grupo PC quando comparados com o grupo SP, tanto para as células cultivadas com rHmuY ( $p=0,000$ ), quanto aquelas cultivadas sem estímulo ( $p=0,000$ ) (Gráfico 1D).



**Gráfico 01** - Produção de citocinas por CMSP nos sobrenadantes de cultura dos grupos SP e PC. Secreção das citocinas interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (A), interleucina-4 (IL-4) (B), interleucina-10 (IL-10) (\* $p=0,034$ ) (C) e interleucina- 18 (IL-18) (‡ $p=0,000$  e † $p=0,000$ ) (D) nos sobrenadantes de cultura de

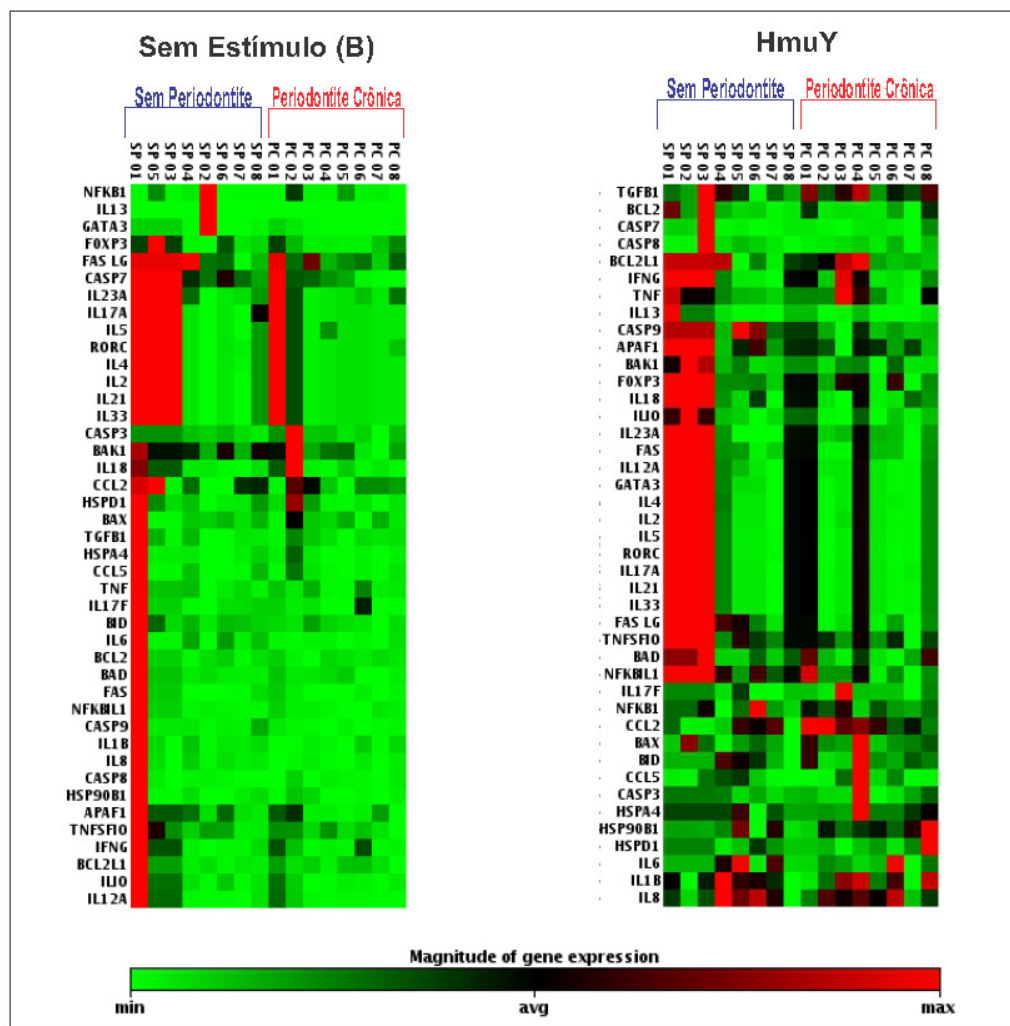
células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de voluntários sem periodontite (SP) e com periodontite crônica (PC).

## 6.2 - EXPRESSÃO GÊNICA POR CMSP

Os conjuntos de dados brutos foram analisados usando o “PCR array data analysis template” disponível em <http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php> e os testes de qualidade foram realizados utilizando o software integrado baseado na Web automatizado (“*web-based automated software*”). O software identificou GUSB (Beta Glucoronidase) como o gene de manutenção mais estavelmente expresso para normalização dos dados. Os resultados da expressão gênica por Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP) nos grupos de pacientes com periodontite crônica foram dados pelo nível de expressão gênica relativa, onde os genes avaliados apresentaram-se “*upregulated*” ou “*downregulated*” quando comparados com os transcritos obtidos das CMSP de pacientes sem periodontite crônica. Foram considerados os genes que apresentaram expressão com nível de significância  $p < 0,05$  e os que apresentaram uma tendência de significância estatística com  $0,05 < p < 0,1$ . Os resultados foram apresentados através de “*Heat Map*”, gráficos e tabelas.

### 6.2.1- PADRÃO DE EXPRESSÃO DE mRNA - “*HEAT MAP*”

A análise do padrão de expressão de mRNA indicou separadamente diferenças na expressão gênica inerentes aos grupos PC e SP para as células sem estimulação antigênica e estimuladas com rHmuY. A variabilidade do padrão de expressão genética global entre as amostras de PC e SP, especialmente nas amostras de CMSP nos grupos PC e SP estimulados com rHmuY indicaram heterogeneidade. Tanto para as células estimuladas com rHmuY, quanto para aquelas sem estimulação antigênica (B), as CMSP de indivíduos sem periodontite apresentaram maior número de genes “*upregulated*”, já os indivíduos com periodontite crônica apresentaram um perfil de expressão gênica “*downregulated*”. As diferenças foram mais evidentes nos grupos SP e PC estimulados com rHmuY (Figura 6).



**Figura 06** - Perfil de Expressão de mRNA - “Heat Map”. Identificação de clusters gênicos envolvidos em mecanismos de apoptose, proteínas de choque térmico, citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição por CMSP de pacientes com periodontite crônica (PC) e sem (SP) sob estímulo de rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* e na ausência de estímulos. O gradiente de cor verde-preto-vermelho representa níveis relativos de expressão gênica, indicando “Under-Even-Over” regulação, respectivamente.

**Tabela 05** – Expressão genética diferencial entre os grupos PC e SP no estímulo com rHmuY e sem estimulação.

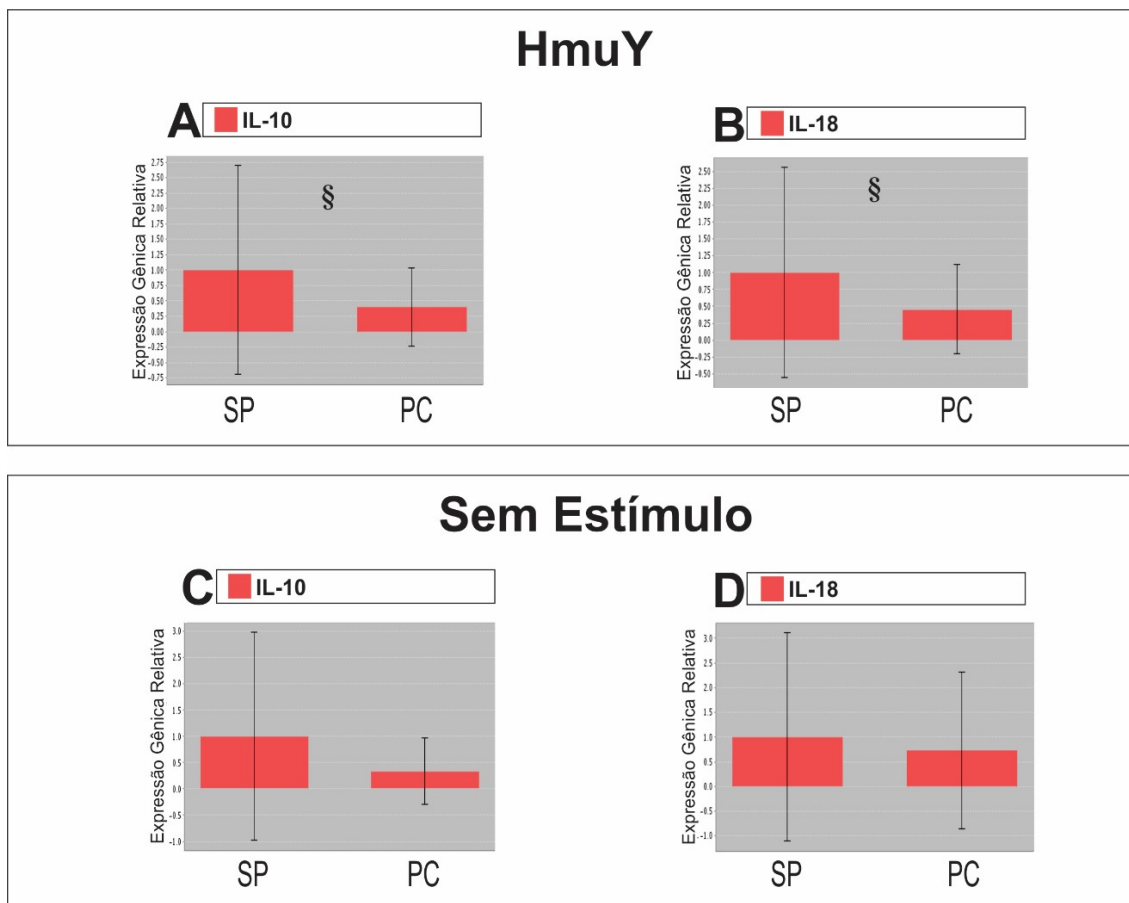
SEM ESTÍMULO (B)			
Gene	Descrição	Valor de P	Ontologia Gênica
<b>“Downregulated”</b>			
CASP7	Caspase 7, cisteína relacionada à apoptose	0,0499	Cisteína contendo protease aspartato-específica, da subfamília da CASP3, armazenada no espaço intermembranico mitocondrial e liberada no citosol após estímulo apoptótico apropriado, promove apoptose.



<b>rHmuY (HmuY)</b>			
<b>Gene</b>	<b>Descrição</b>	<b>Valor de P</b>	<b>Ontologia Gênica</b>
<b>“Upregulated”</b>			
CCL2	Quimiocina (C-C motif) ligante 2	0,0245	Fator quimiotático que atrai monócitos e basófilos
<b>“Downregulated”</b>			
NFKBIL1	Fator nuclear ativador do polipeptídeo leve kappa em células-B	0,0358	Este gene codifica um membro divergente da família de proteínas I-kappa-B, envolvido na regulação da resposta imune inata e contribui para a regulação negativa da ativação da transcrição de genes alvo NF-kappa-B
IL10	Interleucina 10	0,0978	A proteína codificada por este gene é uma citocina produzida primariamente por monócitos e em menor extensão por linfócitos. Inibe a síntese de citocinas, incluindo IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF e GM-CSF produzidos por macrófagos ativados e células T auxiliares.
IL18	Interleucina 18	0,0808	A proteína codificada por este gene é uma citocina pró-inflamatória que aumenta a atividade de células NK em esplenócitos e estimula a produção de IFN- $\gamma$ por linfócitos Th1.
BAK1	BCL2-antagonista/morte 1	0,0849	A proteína codificada por este gene faz parte da família de proteínas BCL2. Está localizada na mitocôndria e tem a função de induzir apoptose.
CASP9	Cisteína peptidase relacionada à apoptose	0,0027	Protease cisteína contendo aspartato, largamente expressa, ativada pelo complexo multimérico APAF1- Citocromo c, que inicia a cascata das caspases pela ativação da CASP3
TNFSF10 (TRAIL)	Superfamília do Fator de Necrose Tumoral (ligante), membro 10	0,0553	Induz apoptose em células transformadas e tumorais.
FAS	Fas (receptor de TNF superfamília, membro 6)	0,0875	Este receptor contém um domínio de morte. Desempenha um papel central na regulação fisiológica da morte celular programada
FAS LG	Fas ligante (superfamília do TNF, membro 6)	0,0120	A função primária da proteína transmembrana codificada é a indução de apoptose desencadeada pela ligação ao FAS
APAF1	Peptidase apoptótica ativador do Fator-1	0,0478	Este gene codifica uma proteína citoplasmática que inicia a apoptose

### 6.2.2 - EXPRESSÃO DE mRNA DE GENES RELACIONADOS À CITOCINAS POR CMSP NOS GRUPOS SP E PC COM E SEM ESTÍMULO DE rHmuY

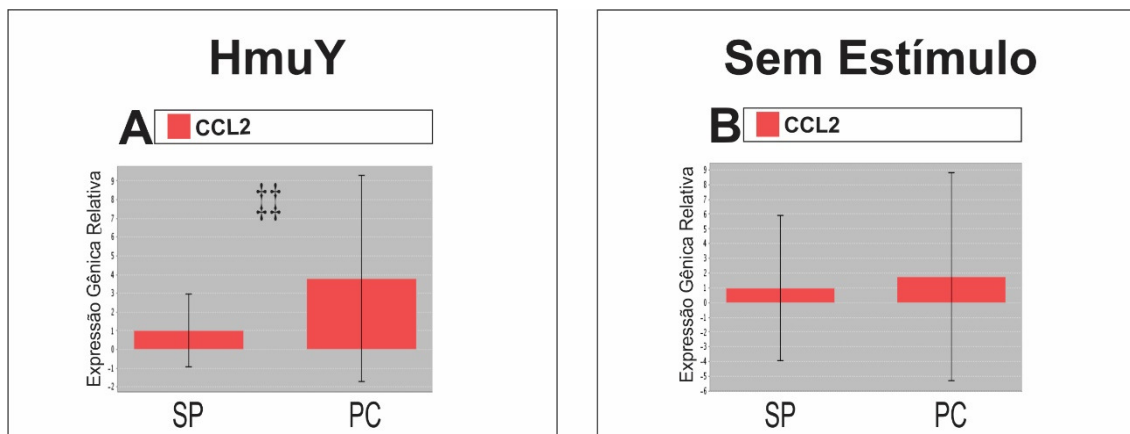
Foram observados baixos níveis, com tendência de significância estatística, de expressão gênica relativa para IL-10 e IL-18 por CMSP dos indivíduos do grupo PC quando comparadas às células de indivíduos do grupo SP após cultura com estímulo de HmuY ( $0,05 < \text{p} < 0,1$ ) (Gráfico 02, A e B). Entretanto quando as CMSP dos grupos SP e PC foram cultivadas sem estimulação, os dados não mostraram significância estatística (Gráfico 02, C and D).



**Gráfico 02:** Expressão de mRNA para IL-10 e IL-18 em CMSP dos grupos SP e PC sob estímulo de rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* e em células não estimuladas. A-D. Grupos funcionais de genes envolvidos em processos inflamatórios foram “*dowregulated*” com tendência de significância estatística ( $0,05 < p < 0,1$ ) em CMSP do grupo PC sob estímulo de rHmuY.

### 6.2.3 - EXPRESSÃO mRNA PARA CCL2 EM CMSP NOS GRUPOS SP E PC COM E SEM ESTÍMULO DE rHmuY

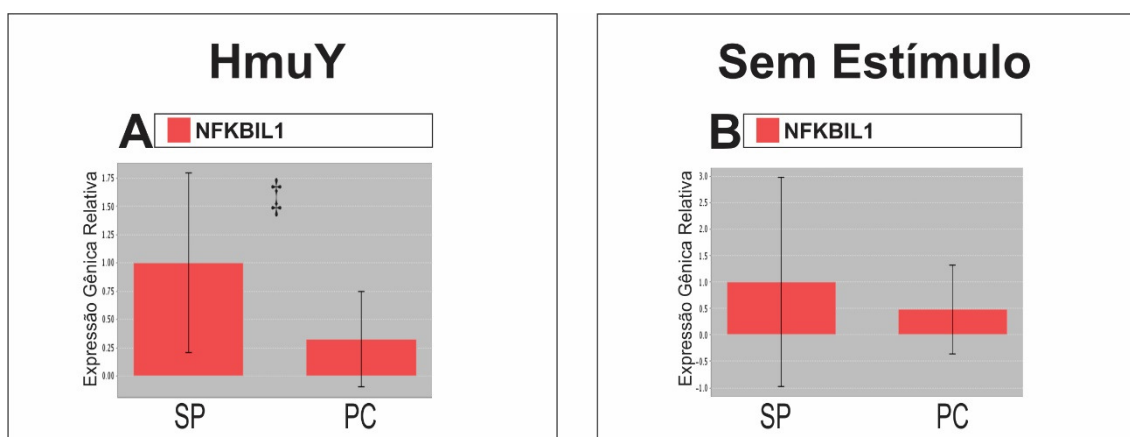
Foram observados altos níveis de expressão gênica relativa, estatisticamente significantes para CCL-2 por CMSP de indivíduos do grupo PC quando comparados com os níveis de expressão das células de indivíduos do grupo SP quando as células foram cultivadas sob estímulo rHmuY ( $p=0,0245$ ) (Gráfico 03, A). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para a expressão de CCL2 em CMSP não estimuladas entre os grupos SP e PC. (Gráfico 03, B).



**Gráfico 03:** Expressão de mRNA para CCL2 em CMSP dos grupos SP e PC sob estímulo de rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* e em células não estimuladas. A-B. Grupo funcional de gen envolvido na codificação de quimiocina “upregulated” com significância estatística ( $p=0,0245$ ) em CMSP do grupo PC.

#### 6.2.4 - EXPRESSÃO DE mRNA PARA NFKBIL1 EM CMSP NOS GRUPOS SP E PC COM E SEM ESTÍMULO DE rHmuY

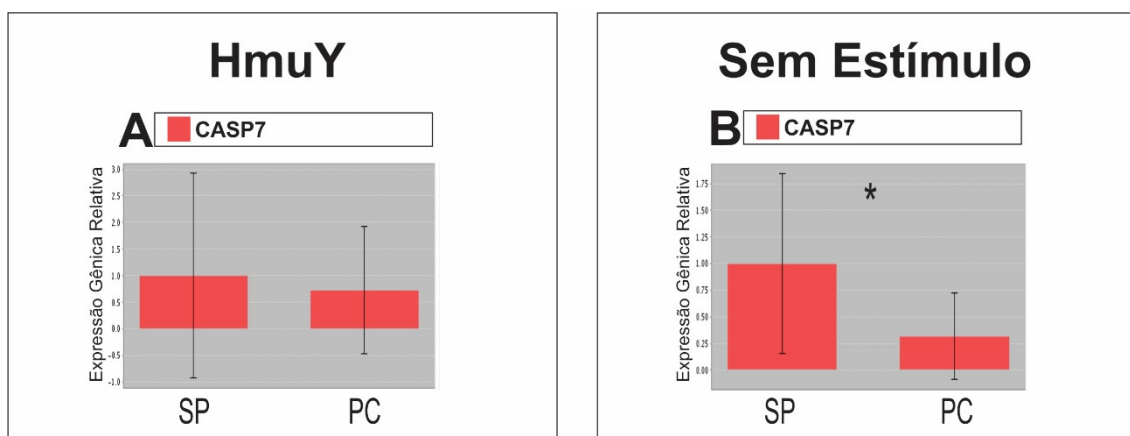
Foram observados baixos níveis de expressão gênica relativa, estatisticamente significantes, para NFKBIL1 por CMSP em indivíduos do grupo PC quando comparados aos níveis de expressão para as células de indivíduos do grupo SP sob estímulo de rHmuY ( $p=0,0358$ ) (Gráfico 04, A). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para a expressão de NFKBIL1 por CMSP não estimuladas entre os grupos SP e PC (Gráfico 04, B).



**Gráfico 04:** Expressão de mRNA para NFKBIL1 em CMSP dos grupos SP e PC sob estímulos de rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* (A) e em células não estimuladas (B). Grupo funcional de gene envolvido na inibição da via NFkB que foram “downregulated” com significância estatística ( $p=0,0358$ ) em CMSP do grupo PC.

### 6.2.5 - EXPRESSÃO DE mRNA PARA GENES RELACIONADOS À APOPTOSE NAS VIAS INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA DE MORTE CELULAR PROGRAMADA

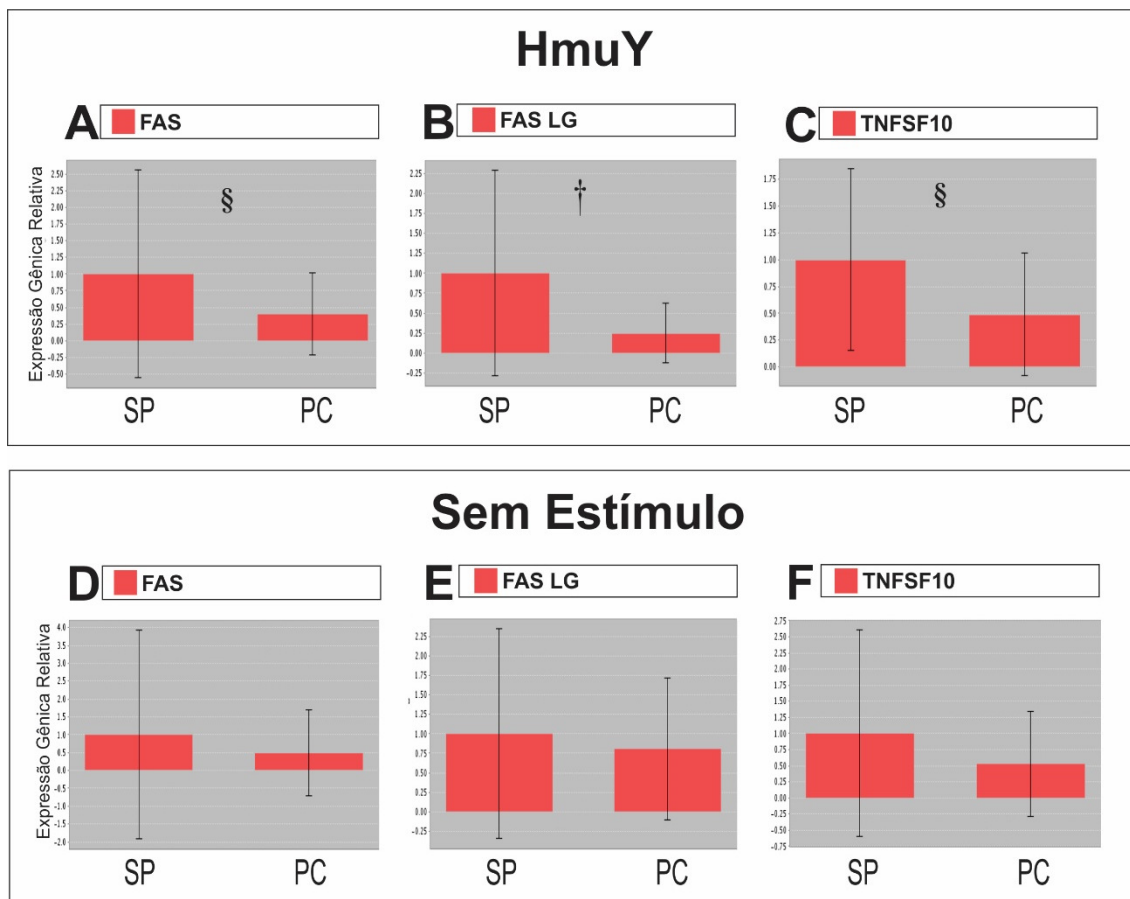
Foram observados baixos níveis de expressão de mRNA, estatisticamente significantes, para caspase-7 por CMSP em indivíduos do grupo PC quando comparados com os níveis de expressão por células do grupo SP quando as células foram cultivadas sem estimulação ( $p = 0,0499$ ) (Gráfico 05, B). Não foram observadas diferenças significantes nos níveis de expressão de CASP7 quando as CMSP foram estimuladas com rHmuY entre os grupos SP e PC ( $p = 0,4055$ ) (Gráfico 05, A).



**Gráfico 05:** Expressão de mRNA para gene relacionado às vias intrínseca e extrínseca de apoptose em CMSP dos grupos SP e PC sob estímulo de rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* (A) e células não estimuladas (Sem Estímulo) (B). Grupo funcional de gene envolvido na morte celular programada que foram “downregulated” com significância estatística ( $p < 0,05$ ) em CMSP do grupo PC. Caspase 7, Cisterna peptidase relacionada a apoptose. \* $p=0,0499$ .

### 6.2.6 - EXPRESSÃO DE mRNA PARA GENES RELACIONADOS À APOPTOSE NA VIA EXTRÍNSECA DE MORTE CELULAR PROGRAMADA

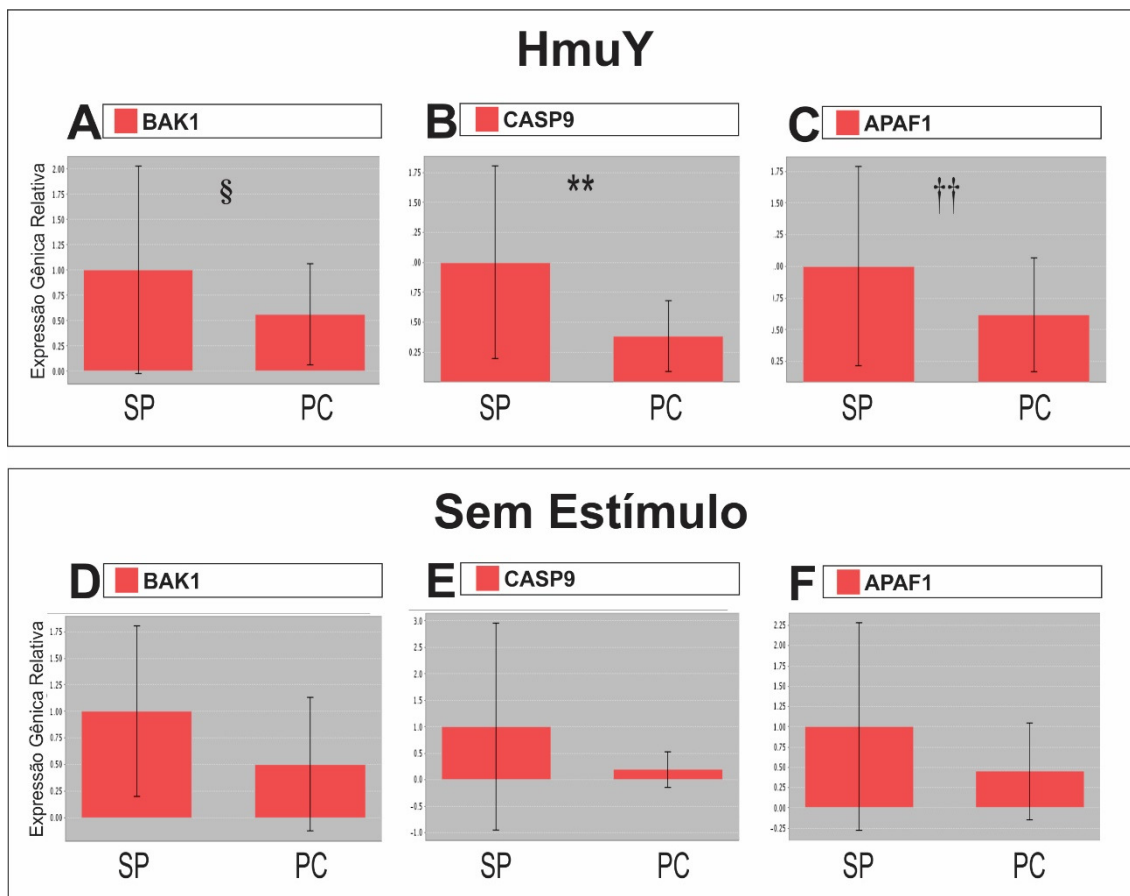
Foram observados baixos níveis de expressão gênica relativa FAS, FAS Ligante e TNFSF10 (TRAIL) por CMSP de indivíduos do grupo PC quando comparados com o grupo SP sob estímulo de rHmuY, mostrando diferenças estatisticamente significantes para FAS LG ( $p=0,0120$ ) (Gráfico 06, B) e tendência de significância para FAS e TNFSF10 ( $0,05 < \text{§}p < 0,1$ ) (Gráfico 06, A e C). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para a expressão de FAS, FAS Ligante e TNFSF10 (TRAIL) por células não estimuladas nos grupos SP e PC (Gráfico 6, D, E e F).



**Gráfico 06:** Expressão de mRNA para genes relacionados à via extrínseca de apoptose em CMSP nos grupos SP e PC sob estímulo de rHmuY e sem estimulação. A-F. Grupos funcionais de genes envolvidos na morte celular programada que foram “downregulated” com significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) ou tendência de significância ( $0,05 < p < 0,1$ ) em CMSP do grupo PC. (A e D) FAS (Receptor da superfamília TNF, Membro 6) (B e E) FAS lligante (Superfamília do TNF, membro 6). (C e F) Ligante da superfamília do TNF, membro 10. † $p=0.012$  and § $p<0.1$ .

### 6.2.7 - EXPRESSÃO DE mRNA PARA GENES RELACIONADOS À APOPTOSE NA VIA INTRÍNSECA DE MORTE CELULAR PROGRAMADA

Foram observados baixos níveis de expressão gênica relativa, estatisticamente significativa, para BAK1, CASP9 e APAF1 por CMSP de indivíduos do grupo PC quando comparados aos níveis de expressão das células do grupo SP para CASP9 ( $p=0,0027$ ) e APAF1 ( $p=0,0478$ ) (Gráfico 07, B e C) e tendência de significância para BAK1 ( $0,05 < §p < 0,1$ ) (Gráfico 07, A). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para a expressão de BAK1, CASP9 e APAF1 por células não estimuladas entre os grupos SP e PC (Gráfico 07, D, E e F).



**Gráfico 07:** Expressão de mRNA de genes relacionados à via intrínseca de apoptose em CMSP dos grupos SP e PC sob estímulo de rHmuY e sem estimulação. A-F. Grupo funcional de genes em morte celular programada foram “downregulated” com significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) ou tendência de significância ( $0,05 < p < 0,1$ ) em CMSP do grupo PC. (A e D) BCL2-antagonista/morte 1. (B e E) Caspase 9, cisteína peptidase relacionada à apoptose (C e F) Peptidase apoptotótica ativador do fator 1. \*\* $p=0,0027$ , †† $p=0,0478$  e § $p<0,1$ .

## 7- DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores demonstraram o potencial imunogênico de HmuY de *Porphyromonas gingivalis* por demonstrar o seu papel no processo inflamatório, induzindo altos níveis de Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-10 (IL-10) em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de indivíduos com periodontite crônica (TRINDADE, 2012a), além de participar e interferir em mecanismos de morte celular (TRINDADE, 2012b; CARVALHO-FILHO, 2013). O presente estudo representa um avanço nos conhecimentos sobre o papel de HmuY de *Porphyromonas gingivalis* na imunopatogênese da periodontite, pois pela primeira vez foi demonstrada uma assinatura molecular através da expressão de mRNA de genes relacionados à apoptose e resposta inflamatória em CMSP de indivíduos com periodontite crônica sob estímulos desta proteína altamente específica de *P. gingivalis*.

Nossos dados demonstraram a produção aumentada de IL-18 no grupo com periodontite crônica quando comparados aos níveis desta citocina para o grupo sem periodontite por CMSP estimuladas por rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* e também por CMSP não estimuladas. Este achado indica um perfil pró-inflamatório pelos altos níveis de IL-18 em indivíduos portadores de periodontite crônica e o seu papel na imunopatogênese da doença. Entretanto o perfil de produção de IL-18 foi semelhante, tanto nas células estimuladas por rHmuY, quanto pelas CMSP sem estimulação antigênica, sugerindo que HmuY não foi capaz de alterar os níveis de IL-18 nos grupos estudados.

Existem poucos estudos que têm abordado o envolvimento de IL-18 mediando da resposta do hospedeiro à patógenos periodontais e danos teciduais associados (YILMAZ, 2015; YOSHINAKA, 2014; DE CAMPOS, 2012; PRADEEP, 2009), diferentemente de IL-1P, já que seu papel na patogênese da periodontite é suportado por um corpo consistente de estudos (OH, 2015; LING, 2015; ZHU, 2015; SHYU, 2015; Sasaki, 2015; LAM, 2014; REIS, 2014; GILOWSKI, 2014; ZHAO, 2012; TRINDADE, 2012).

Nossos dados não demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação a produção de IL-ip por CMSP entre os grupos estudados, SP e PC, quando estimuladas por HmuY. TRINDADE et al. (2012a) demonstrou maiores níveis de IL-1 $\beta$  em pacientes com periodontite crônica sob este mesmo estímulo. Além disto, no presente estudo observou-se a secreção aumentada de IL-18 nos sobrenadantes de cultura por CMSP de indivíduos com periodontite crônica em comparação ao grupo sem periodontite, tanto para as células estimuladas com rHmuY, quanto para aquelas sem estimulação

antigênica. Uma explicação plausível para este achado é que, embora IL1 - P e IL-18 pertençam à mesma família de citocinas, sua expressão gênica e secreção são reguladas de forma diferenciada em resposta a *Porphyromonas gingivalis*, como foi demonstrado por HAMED et al., (2009) num estudo avaliando a produção e expressão destas citocinas em monócitos humanos.

Também foi examinada a produção de interleucina-4 por se tratar de uma importante citocina que é característica de um perfil Th2, considerado protetor em relação à periodontite (REYNOLDS, 2015; BEHFARNIA, 2013), assim como IL-10 que também possui ação protetora para os tecidos periodontais por modular e regular a produção de citocinas pró-inflamatórias (LEWKOWICZ, 2015; EBERSOLE, 2015; JIN, 2013). A produção diminuída de IL-10 no grupo PC sugere uma deficiente secreção de uma citocina que poderia modular e regular o processo inflamatório. O estudo de NAVARRETE, et al (2014) revelou um aumento dos níveis de IL-4 produzidos por macrófagos em biópsias de tecidos gengivais de indivíduos com periodontite crônica na comparação com estes mesmos tipos celulares em indivíduos saudáveis. Provavelmente em nosso estudo, a avaliação da secreção de IL-4 nos sobrenadantes de cultura não foi suficiente para detectar diferenças na produção desta citocina entre os grupos. Em relação aos resultados de IL-10, os dados do presente estudo não concordaram com Trindade et al. (2012a), que encontraram altos níveis de IL-10 em pacientes com periodontite crônica.

Os dados relativos a expressão de mRNA para IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 e IL-18 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre as CMSP dos grupos SP e PC com estímulo de rHmuY de *P. gingivalis* e sem estímulo. Entretanto, IL-10 e IL-18 exibiram uma tendência de significância estatística, com estes genes “*downregulated*” no grupo com periodontite crônica, para as CMSP estimuladas com rHmuY. Isto se deve, possivelmente pelo número de amostras para a realização deste ensaio, o que pode ter comprometido o poder da análise. EBERSOLE et al., (2014), num estudo com macacos rhesus, mostraram a “*downregulation*” na expressão de mRNA para IL-18 na fase de iniciação e progressão da periodontite e uma “*upregulation*” na expressão de mRNA para IL-10 na fase de resolução da doença.

Também não houve diferenças significantes entre os grupos SP e PC na expressão gênica e secreção de IL-4 nos sobrenadantes de cultura de CMSP. O estudo de PIETRUSKA, et al. (2004) não demonstrou diferenças significantes entre níveis de IL-4 produzidos por CMSP de pacientes com periodontite crônica e agressiva, quando comparados com indivíduos saudáveis. Entretanto BAEK, et al. (2013) encontraram uma



expressão aumentada de IL-4 por fibroblastos gengivais (FG) de indivíduos saudáveis na ausência e presença de *P. gingivalis*, quando comparados aos FG de indivíduos com periodontite.

A expressão de mRNA para CCL2 por CMSP foi “*upregulated*” no grupo PC estimuladas com rHmuY. A quimiocina codificada por este gene é também conhecida como proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), sendo uma potente quimiocina que atrai monócitos e macrófagos. MCP-1 é membro da subfamília de quimiocinas CC e seus efeitos são exercidos através da ligação a receptores ligados à proteína G na superfície de leucócitos, objetivando a ativação e migração destas células (YADAV, 2010). O estudo de PRADEEP et al., (2009), através da avaliação da produção de citocinas e quimiocinas no fluido gengival, revelou uma correlação positiva entre os níveis de IL-18 e MCP-1, observando-se concentrações aumentadas na doença periodontal na comparação com o controle saudável e ainda, uma correlação positiva com a gravidade da doença. MAEDA et al., (2015) sugeriram que a ativação da via MyD88 pelo baixo nível de expressão de IL-1 $\beta$  constitutiva é essencial para induzir a expressão de CXCL2 e CCL2 em osteoblastos.

Os resultados do presente estudo mostraram a “*downregulation*” da expressão de mRNA para NFKBIL1 nas CMSP de indivíduos do grupo PC sob estímulo de rHmuY de *P. gingivalis*. Este achado sugere que HmuY pode reduzir, ainda em nível transcricional, a expressão de mRNA para NFKBIL1, gene este que está implicado na modulação negativa da ativação da via NF- $\kappa$ B, o que poderia facilitar a expressão de genes pró-inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão por esta via.

Estes resultados corroboram com o estudo de Scheres et al., (2011) que encontraram baixos níveis de expressão de NFKBIL1 em fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal, antes e depois do desafio in vitro com *Porphyromonas gingivalis* viáveis. Entretanto, sua denominação se deve à homologia limitada com membros da família de proteínas do inibidor de NFKB (IKB), mas outro papel também foi proposto, por envolvimento no processamento de mRNA e regulação da translação (GREETHAM, 2007).

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).

Nossos dados mostraram diferenças entre os grupos estudados em relação ao perfil de expressão de mRNA para genes que participam da sinalização molecular de apoptose. Na via extrínseca, HmuY de *P. gingivalis* foi capaz de promover a “downregulation” de mRNA para os genes FAS, FAS ligante e TNFSF10 em CMSP de indivíduos do grupo PC, sugerindo a redução ou inibição de apoptose nas etapas iniciais de sinalização por esta via.

FIRTH et al., (2013), usando um modelo de periodontite por lipopolissacarídeo em ratos, identificaram a “upregulation” de mRNA para IL-1 $\beta$  e FAS ligante. BROZOVIC et al., (2006) demonstraram que *Porphyromonas gingivalis* mortas pelo calor induziram apoptose em células epiteliais gengivais humanas (CEGH) e que a expressão de mRNA para FAS e FAS-L nestas células foi “upregulated”. TRAIL / Apo-2L /TNFSF10 é um membro da superfamília do TNF descrito pela primeira vez como uma citocina indutora de apoptose em 1995. Semelhante ao TNF e FAS ligante, TRAIL induz apoptose de modo caspase-dependente seguido pela trimerização de receptor de morte TRAIL (AMARANTE-MENDES, 2015). BRUNETTI et al., (2011) demonstraram em CMSP de doadores saudáveis que TRAIL pode induzir a formação de osteoclastos na ausência de RANKL e que foram detectados altos níveis de TRAIL no soro de pacientes com periodontite. Já MORI et al., (2007) sugeriram que a perda óssea alveolar em pacientes com periodontite poderia ser devido ao aumento da apoptose mediada por TRAIL em osteoblastos.

Ainda, HmuY de *P. gingivalis* reduziu os níveis de expressão de genes envolvidos na via intrínseca de apoptose, como BAK1, APAF1 e CASP9 por CMSP de indivíduos do grupo PC, sugerindo também o papel de HmuY em impedir a ativação da cadeia sinalizadora desta via à nível transcricional em pacientes com periodontite crônica.

Estímulos apoptóticos intrínsecos, tais como danos ao DNA ou estímulos estressores ao retículo endoplasmático, podem ativar proteínas BH3 que levam à ativação de BAX e BAK e por consequência, à permeabilização da membrana mitocondrial externa (PMME). A proteína anti- apoptótica BCL-2 evita a PMME pela ligação com proteínas BH3 e com BAX ou BAK ativadas. Após a PMME, ocorre a liberação de várias proteínas do espaço intermembranar mitocondrial (EIM), promovendo a ativação de caspases e apoptose. O citocromo c liga-se à APAF1, induzindo a sua oligomerização e formando assim uma estrutura denominada apoptossomo que recruta e ativa um iniciador

de caspase, a caspase 9, que por sua vez, cliva e ativa caspases executoras, caspase 3 e caspase 7, levando à apoptose. (STEPHEN, 2010).

Nossos resultados indicam diferenças na expressão de mRNA referentes aos alvos que participam da sinalização molecular de apoptose na via intrínseca por CMSP dos grupos SP e PC sob estímulo de rHmuY e sem estimulação. Houve diferenças estatisticamente significantes na expressão de mRNA para caspase 9 e APAF1 e uma tendência de significância para a expressão de BAK1, com “*dowregulation*” destes genes nas CMSP do grupo PC sob estimulação com rHmuY. Nas células não estimuladas, a expressão de mRNA para caspase 7 foi também “*downregulated*” significativamente no grupo PC. Poucos trabalhos na literatura atual têm demonstrado a participação da via intrínseca de apoptose na periodontite. A maioria dos estudos sobre esta via na doença periodontal incluem moléculas anti-apoptóticas, como BCL-2, BCL-X e BCL-6 (WANG, 2015; Lakschevitz, 2013; CARVALHO-FILHO, 2013; SEMLALI, 2011; TONETTI, 1998).

YOSHIMOTO et al., (2015), em um experimento com linhagens de células epiteliais humanas (OBA9) estimuladas com TGF- $\pi$  recombinante, demonstraram um perfil pró-apoptótico, uma elevada atividade de caspase-3 e um alto número de células apoptóticas TUNEL-positivas. Além disso, os níveis de proteínas pró-apoptóticas BAX, BAK, BIM, e BAD foram aumentados em OBA9 estimuladas com TGF- $\beta$ 1, e o tratamento de TGF- $\pi$  também diminuiu os níveis de proteínas anti-apoptóticas, como BCL-2 e BCL-XL de maneira tempo-dependente. TGF-  $\beta$ 1 “*upregulate*” os níveis de proteína de caspase-9 clivada. Estes resultados indicaram que a apoptose induzida por TGF-  $\beta$ 1 envolveu a via intrínseca mitocondrial. Entretanto, o estudo de BOISVERT et al., (2010) mostrou a manipulação de funções mitocondriais por *Porphyromonas gingivalis* e por seu peptídeo de adesão A44 em células epiteliais durante as primeiras horas de infecção, dificultando o “*clearence*” pelas células do hospedeiro para remover as células infectadas em processo de apoptose, sugerindo que este mecanismo pode permitir que as bactérias persistam protegidas no ambiente celular até ao passo seguinte na patogênese, progressão ou resolução da infecção.

A literatura ainda é incipiente no estudo da expressão de genes relacionados com os mecanismos inflamatórios e apoptose na periodontite crônica, o que faz com que o nosso estudo, tenha uma contribuição importante para a compreensão da interação entre o agente patogênico e o hospedeiro no início e progressão da doença. No entanto, a quantidade de amostras para a avaliação da expressão dos genes é geralmente limitada e

pode comprometer o poder de análise, embora a técnica de PCR em tempo real seja extremamente sensível para a avaliação dos alvos gênicos. Assim, uma vez que nossos resultados demonstraram a capacidade HmuY de *Porphyromonas gingivalis* ativar a resposta imunológica por induz a inflamação nos tecidos periodontais e aumentar a sobrevivência de células inflamatórias por inibição de apoptose, mantendo desta forma um estado crônico de inflamação tecidual, são necessários estudos futuros para examinar os mecanismos de escape que capacitam este agente patogênico na evasão do sistema imune do hospedeiro.

## 8- CONCLUSÃO

O presente estudo avança através da demonstração de novos conhecimentos sobre o papel de HmuY na imunopatogênese da periodontite crônica, uma vez que esta proteína pode capacitar *Porphyromonas gingivalis* em um processo de evasão ao sistema imunológico do hospedeiro, contribuindo desta forma para a manutenção do quadro infeccioso/inflamatório na periodontite crônica. Este patógeno-chave pode induzir a permanente produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no microambiente do tecido periodontal inflamado, aumentando a sobrevivência por inibição de apoptose, resultando assim, no estado inflamatório crônico de destruição do periodonto e possivelmente no estabelecimento do processo disbiótico nos indivíduos acometidos pela doença.

De acordo com os métodos empregados neste estudo e diante de suas limitações, conclui-se que:

- rHmuY de *P. gingivalis* induz resposta inflamatória em CMSP de pacientes com periodontite, por aumentar níveis de CCL2 e IL-18, bem como inibir NFKBIL-1 e IL-10.
- rHmuY de *P. gingivalis* inibe genes relacionados a via extrínseca de apoptose por diminuir a expressão gênica relativa para FAS, FAS ligante e TNFSF10 em CMSP de indivíduos do grupo PC.
- rHmuY de *P. gingivalis* inibe genes relacionados a via intrínseca de apoptose por diminuir a expressão gênica relativa para BAK1, APAF1 e CASP9 em CMSP de indivíduos do grupo PC.
- rHmuY de *P. gingivalis* não modifica a expressão de genes que codificam proteínas de choque térmico (HSP) e fatores de transcrição em CMSP do grupo PC.

## 9 – REFERÊNCIAS

- AINAMO, J.; BAY, I. Periodontal indexes for and in practice. **Tandlaegebladeer**, v.80, n.5, p.149-152, 1976.
- AMARANTE-MENDES, G.P.; GRIFFITH, T.S. Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond. **Pharmacol Ther.** v.15, p.166-167, 2015.
- AN, J.; NAKAJIMA, T.; SHIBATA, H.; ARIMURA, T.; YASUNAMI, M.; KIMURA, A. A novel link of HLA locus to the regulation of immunity and infection: NFKBIL1 regulates alternative splicing of human immune-related genes and influenza virus M gene. **J Autoimmun.**v.47, p.25-33, 2013.
- 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.
- ARAÚJO-PIRES, A.C.; FRANCISCONI, C.F.; BIGUETTI, C.C.; CAVALLA, F.; ARANHA, A.M.; LETRA, A.; TROMBONE, A.P.; FAVERI, M.; SILVA, R.M.; GARLET, G.P. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. **J Appl Oral Sci.** v.22, p.336-346, 2014.
- ARMITAGE, G.C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. **Periodontol 2000.** v.34, p.9-21, 2004.
- ARUN, K.V.; TALWAR, A.; KUMAR, T.S. T-helper cells in the etiopathogenesis of periodontal disease: A mini review. **J Indian Soc Periodontol.** v.15, p.4-10, 2011.
- ASAI, Y.; HASHIMOTO, M.; FLETCHER, H.M.; MIYAKE, K.; AKIRA, S.; OGAWA, T. Lipopolysaccharide preparation extracted from *Porphyromonas gingivalis* lipoproteindeficient mutant shows a marked decrease in toll-like receptor 2-mediated signaling. **Infect Immun.** v.73, p.2157-63, 2005.
- ASHIMOTO, A. et al. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol Immunol**, v. 11, p.266-273, 1996.

ATZEI, P.; GARGAN, S.; CURRAN, N.; MOYNAGH, P.N. Cactin targets the MHC class III protein IkappaB-like (IkappaBL) and inhibits NF-kappaB and interferon-regulatory factor signaling pathways. **J Biol Chem.** v.19, p.36804-36817, 2010.

BAEK, K.J; CHOI, Y; JI, S. Gingival fibroblasts from periodontitis patients exhibit inflammatory characteristics in vitro. **Arch Oral Biol.** v.58, p.1282-1292, 2013.

BANU, S.; JABIR, N.R.; MOHAN, R.; MANJUNATH, N.C.; KAMAL, M.A.; KUMAR, K.R.; ZAIDI, S.K.; KHAN. M.S.; TABREZ, S. Correlation of Toll-like receptor 4, interleukin-18, transaminases, and uric acid in patients with chronic periodontitis and healthy adults. **J Periodontol.** v.86, p.431-439, 2015.

BARNES, P.J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol Sci.** v.14, p.436-441, 1993.

BEHFARNIA, P.; BIRANG, R.; PISHVA, S.S.; HAKEMI, M.G.; KHORASANI, M.M. Expression levels of th-2 and th-17 characteristic genes in healthy tissue versus periodontitis. **J Dent (Tehran).** v.10, p.23-31, 2013.

BEKLEN, A.; TSAOUS MEMET, G. Interleukin-1 superfamily member, interleukin-33, in periodontal diseases. **Biotech Histochem.** v.89, p. 209-214, 2014.

BENAKANAKERE, M.; KINANE, D.F. Innate cellular responses to the periodontal biofilm. **Front Oral Biol.** v.15, p. 41-55, 2012.

BENEDETTO, A.B.; GIGANTE, I.; COLUCCI, S.; GRANO, M. Periodontal Disease: Linking the Primary Inflammation to Bone Loss. **Clin Dev Immunol.** 503754, 2013.

BENGTSSON, T.; KHALAF, A.; KHALAF, H. Secreted gingipains from *Porphyromonas gingivalis* colonies exert potent immunomodulatory effects on human gingival fibroblasts. **Microbiol Res.** v.178, p.18-26, 2015.

BOISVERT, H.; DUNCAN, M.; Translocation of *Porphyromonas gingivalis* gingipain adhesin peptide A44 to host mitochondria prevents apoptosis. **Infect Immun.** v.78, p.3616- 3624, 2010.

BOSTANCI, N.; BELIBASAKIS, G.N. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. **FEMS Microbiol Lett.** v.333, p.1-9, 2012.

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.

BRASIL. Resolução 196, de 10 de outubro de 1996. Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Brasília: Conselho Nacional de Saúde**, 1996, 24p.

BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. **Nat Genet**. v.21, p.33-37, 1999.

BROZOVIC, S.; SAHOO, R.; BARVE, S.; SHIBA, H.; URIARTE, S.; BLUMBERG, R.S.; KINANE, D.F. *Porphyromonas gingivalis* enhances FasL expression via up-regulation of NFkappaB-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cells. **Microbiology**. v.152, p.797-806, 2006.

BRUNETTI, G.; ORANGER, A.; MORI, G.; SARDONE, F.; PIGNATARO, P.; CORICCIATI, M.; NAPOLI, N.; RIZZI, R.; LISO, V.; GRASSI, F.R.; GRANO, M.; COLUCCI, S. TRAIL effect on osteoclast formation in physiological and pathological conditions. **Front Biosci**. v.3, p.1154-1161, 2011.

BUDUNELI, N.; OZÇAKA, O.; NALBANTSOY, A. Interleukin-33 levels in gingival crevicular fluid, saliva, or plasma do not differentiate chronic periodontitis. **J Periodontol**. v.83, p.362-368, 2012.

BYRNE, D.P.; POTEMPA, J.; OLCZAK, T.; SMALLEY, J.W. Evidence of mutualism between two periodontal pathogens: co-operative haem acquisition by the HmuY haemophore of *Porphyromonas gingivalis* and the cysteine protease interpain A (InpA) of *Prevotella intermedia*. **Mol Oral Microbiol**. v.28, p.219-29, 2013.

CARBO, A.; HONTECILLAS, R.; ANDREW, T.; EDEN, K.; MEI, Y.; HOOPS, S.; BASSAGANYA-RIERA, J. Computational modeling of heterogeneity and function of CD4+ T cells. **Front Cell Dev Biol**. v.2, p.31, 2014.

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.



CHEN, X.T.; TAN, J.Y.; LEI, L.H.; CHEN, L.L. Cytokine levels in plasma and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis. **Am J Dent.** v.28, p.9-12, 2015.

CHITRAPRIYA, M.N.; RAO, S.R.; LAVU, V. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in different stages of inflammatory periodontal disease. **J Indian Soc Periodontol.** v.19, p.14- 17, 2015.

CHRISTMAN, J.W.; LANCASTER, L.H.; BLACKWELL, T.S. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. **Intensive Care Med.** v.24, p.1131-1138, 1998.

DA LUZ, F.A.; OLIVEIRA, A.P.; BORGES, D.; BRÍGIDO, P.C.; SILVA, M.J. The physiopathological role of IL-33: new highlights in bone biology and a proposed role in periodontal disease. **Mediators Inflamm.** 342410, 2014.

DARVEAU, R.P.; TANNER, A. ; PAGE, R.C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontol 2000**, v.14, p.12-32, 1997.

DESARDA, H; GAIKWAD, S. Matrix Metalloproteinases & Implication in Periodontitis-A Short Review. **Journal of Dental & Allied Sciences.** v.2, p.66-70, 2013.

DINARELLO, C.A. IL-18: a Th1-inducing proinflammatory cytokine and new member of IL- 1 family. **Clinical Immunology.** v.103, p. 11-24, 1999.

DINARELLO, C.A.; FANTUZZI, G. Interleukin-18 and host defense against infection. **Infectious diseases.** v.187, p.370-384, 2003.

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.

EBERSOLE, J.L.; KIRAKODU, S.; NOVAK, M.J.; STROMBERG, A.J.; SHEN, S.; ORRACA, L.; GONZALEZ-MARTINEZ, J.; BURGOS, A.; GONZALEZ, O.A. Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. **J Clin Periodontol.** v.41, p.853-861, 2014.

EKE, P.I.; PAGE, R.C.; WEI, L.; THORNTON-EVANS, G.; GENCO, R.J. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. **J Periodontol.** v.83, p.1449-1454, 2012.

FIRTH, J.D.; EKUNI, D.; IRIE, K.; TOMOFUJI, T.; MORITA, M.; PUTNINS, E.E. Lipopolysaccharide induces a stromal-epithelial signalling axis in a rat model of chronic periodontitis. **J Clin Periodontol.** v.40, p.8-17, 2013.

FUJITA, Y.; NAKAYAMA, M.; NAITO, M.; YAMACHIKA, E.; INOUE, T.; NAKAYAMA, K.; IIDA, S.; OHARA, N. Hemoglobin receptor protein from *Porphyromonas gingivalis* induces interleukin-8 production in human gingival epithelial cells through stimulation of the mitogen-activated protein kinase and NF-KB signal transduction pathways. **Infect Immun.** v.82, p.202-211, 2014.

GEMMELL, E.; DRYSDALE, K.E.; SEYMOUR, G.J. Gene expression in splenic CD4 and CD8 cells from BALB/c mice immunized with *Porphyromonas gingivalis*. **J Periodontol.** v.77, p.622-33, 2006.

GIEDRAITIS, V.; HE, B.; HUANG, W.X.; HILLERT, J. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphism in expression regulation. **Journal of neuroimmunology.** v.112, p. 146-152, 2001.

GILLESPIE, M.T. Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function. **Arthritis Research & Therapy.** v.9, p.103-106, 2007.

GILOWSKI, L.; WIENCH, R.; PLOCICA, I.; KRZEMINSKI, T.F. Amount of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist in periodontitis and healthy patients. **Arch Oral Biol.** v.59, p.729-734, 2014.

GIOGHA, C.; LUNG, T.W.; PEARSON, J.S.; HARTLAND, E.L. Inhibition of death receptor signaling by bacterial gut pathogens. **Cytokine Growth Factor Rev.** v.25, p.235- 243, 2014.

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.

GREETHAM, D.; ELLIS, C.D.; MEWAR, D.; FEARON, U.; AN ULTAIGH, S.N.; VEALE, D.J.; GUESDON, F.; WILSON, A.G. Functional characterization of NF-kappaB inhibitor-like protein 1 (NfkappaBIL1), a candidate susceptibility gene for rheumatoid arthritis. **Hum Mol Genet.** v.16, p.3027-3036, 2007.

GUNSOLLEY, J. C. et al effects of RACE and periodontal status on antibody reactive with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4. **J Periodontol Res.** v. 23, p.303-307, 1988.

HAIJSHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunology.** v.15, p.30-44, 2015.

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

HAKKI, S.S.; BALCI, B.; HAKKI, E.E.; YILMAZ, E.; NOHUTCU, R.M. Identification of the difference in extracellular matrix and adhesion molecules of cultured human gingival fibroblasts versus juvenile hyaline fibromatosis gingival fibroblasts using cDNA microarray analysis. **J Periodontol.** v.76, p.2244-2253, 2005.

HALL, B.M. T Cells: Soldiers and Spies-The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells. **Clin J Am Soc Nephrol.** CJN.06620714, 2015.

HAMEDI, M.; BELIBASAKIS, G.N.; CRUCHLEY, A.T.; RANGARAJAN, M.; CURTIS, M.A.; BOSTANCI, N. *Porphyromonas gingivalis* culture supernatants differentially regulate Interleukin-1b and Interleukin-18 in human monocytic cells. **Cytokine.** v.45, p.99- 104, 2009.

HEBLING, E. Prevenção das doenças periodontais. In: PEREIRA, A. C. (Org). Odontologia em saúde coletiva: planejando ações e promovendo saúde. São Paulo: **Artmed**, 2003, cap. 20, p.346.

HUANG, N.; GIBSON, F.C. Immuno-pathogenesis of Periodontal Disease: Current and Emerging Paradigms. **Current oral health reports.** v.1, p.124-132, 2014.

JIN, Y.; WANG, L.Y.; LIN, X.P. Detection and the immune status of regulatory T cells in experimental periodontitis. **Shanghai Kou Qiang Yi Xue.** v.22, p.487-491, 2013.

KAWAHATA, K; MISAKI, Y; YAMAUCHI, M; TSUNEKAWA, S; SETOGUCHI, K; MIYAZAKI, J; YAMAMOTO, K. Generation of CD4+ CD25+ regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in thymus and from noautoreactive T cells by endogenous TCR expression. **The journal of immunology.** v.168, p.4399-4405, 2002.

KIM, D.M.; RAMONI, M.F.; NEVINS, M.; FIORELLINI, J.P. The gene expression profile in refractory periodontitis patients. **J Periodontol.** v.77, p.1043-1050, 2006.

KONG, F.; ZHENG, D.; SHE, P.; NI, P.; ZHU, H.; XU, H.; SU, Z. *Porphyromonas gingivalis* B cell Antigen Epitope Vaccine, pIRES-ragB'-mGITRL, Promoted RagB-Specific Antibody Production and Tfh Cells Expansion. **Scand J Immunol.** v.81, p.476-482, 2015.

KO SEOGLU, S.; HATIPOGLU, M.; SAGLAM, M.; ENHOÇ, S.; ESEN, H.H. Interleukin- 33 could play an important role in the pathogenesis of periodontitis. **J Periodontal Res.** v.50, p.525-534, 2015.

KUULA, H.; SALO, T.; PIRILÀ, E.; TUOMAINEN, A.M.; JAUHAINEN, M.; UITTO, V.J.; TJÀDERHANE, L.; PUSSINEN, P.J.; SORSA, T. Local and systemic responses in matrix metalloproteinase 8-deficient mice during *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis. **Infect Immun.** v.77, p.850-859, 2009.

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.

L'AM, R.S.; O'BRIEN-SIMPSON, N.M.; LENZO, J.C.; HOLDEN, J.A.; BRAMMAR, G.C.; WALSH, K.A.; MCNAUGHTAN, J.E.; ROWLER, D.K.; VAN ROOIJEN, N.; REYNOLDS, E.C. Macrophage depletion abates *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone resorption in mice. **J Immunol.** v.193, p.2349-2362, 2014.

LEWKOWICZ, N.; MYCKO, M.P.; PRZY GODZKA, P.; CWIKLINSKA, H.; CICHALEWSKA, M.; MATYSIAK, M.; SELMAJ, K.; LEWKOWICZ, P. Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. **Mucosal Immunol.** v.29, 2015.

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. **Microbes Infect.** v.16, p.17-27, 2014.

LIEW, F.Y.; PITMAN, N.I.; Mcinnes, I.B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nature Reviews Immunology.** v.10, p.103-110, 2010.

LIN, F.Y.; HSIAO, F.P.; HUANG, C.Y.; SHIH, C.M.; TSAO, N.W.; TSAI, C.S.; YANG, S.F.; CHANG, N.C.; HUNG, S.L.; LIN, Y.W. *Porphyromonas gingivalis* GroEL induces osteoclastogenesis of periodontal ligament cells and enhances alveolar bone resorption in rats. **PLoS One**. v.9, e102450, 2014.

LING, M.R.; CHAPPLE, I.L.; MATTHEWS, J.B. Peripheral blood neutrophil cytokine hyper-reactivity in chronic periodontitis. **Innate Immun**. v.21, p.714-725, 2015.

LUO, Z.; WANG, H.; WU, Y.; SUN, Z.; WU, Y. Clinical significance of IL-23 regulating IL-17A and/or IL-17F positive Th17 cells in chronic periodontitis. **Mediators Inflamm**. 627959, 2014.

MAEDA, A.; BANDOW, K.; KUSUYAMA, J.; KAKIMOTO, K.; OHNISHI, T.; MIYAWAKI, S.; MATSUGUCHI, T. Induction of CXCL2 and CCL2 by pressure force requires IL-1 $\beta$ -MyD88 axis in osteoblasts. **Bone**. v.74, p.76-82, 2015.

MALCOLM, J.; AWANG, R.A.; OLIVER-BELL, J.; BUTCHER, J.P.; CAMPBELL, L.; ADRADOS PLANELL, A.; LAPPIN, D.F.; FUKADA, S.Y.; NILE, C.J.; LIEW, F.Y.; CULSHAW, S. IL-33 Exacerbates Periodontal Disease through Induction of RANKL. **J Dent Res**. 0022034515577815, 2015.

MILWARD, M.R.; CHAPPLE, I.L.; WRIGHT, H.J.; MILLARD, J.L.; MATTHEWS, J.B.; COOPER, P.R. Differential activation of NF-kappaB and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens. **Clin Exp Immunol**. v.148, p.307-24, 2007.

MORETTI, S.; BARTOLOMMEI, L.; GALOSI, C.; RENGÀ, G.; OIKONOMOU, V.; ZAMPARINI, F.; RICCI, G.; BORGHI, M.; PUCCETTI, M.; PIOBBICO, D.; ERAMO, S.; CONTI, C.; LOMURNO, G.; BARTOLI, A.; NAPOLIONI, V.; ROMANI, L. Fine-tuning of Th17 Cytokines in Periodontal Disease by IL-10. **J Dent Res**. v.94, p.1267-1275, 2015.

MORI, G.; BRUNETTI, G.; COLUCCI, S.; CICCOLELLA, F.; CORICCIATI, M.; PIGNATARO, P.; ORANGER, A.; BALLINI, A.; FARRONATO, D.; MASTRANGELO, F.; TETÈ, S.; GRASSI, F.R.; GRANO, M. Alteration of activity and survival of osteoblasts obtained from human periodontitis patients: role of TRAIL. **J Biol Regul Homeost Agents**. v.21, p. 105-114, 2007.

MURRAY, D. A.; WILTON, J.M.A. Lipopolysaccharide from the Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis* Prevents Apoptosis of HL60-Derived Neutrophils *In Vitro*. **Infection and Immunity**. v.71, n12, p.7232-7235, 2003.

NAGPAL, R.; YAMASHIRO, Y.; IZUMI, Y. The Two-Way Association of Periodontal Infection with Systemic Disorders: An Overview. **Mediators Inflamm**. 793898, 2015.

NAKAHIRA, M.; AHN, H.J.; PARK, C.S.; HAMAOKA, T.; OHTA, T.; KURIMOTO, M.; FUJIWARA, H. Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12- induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1. **Journal of Immunology**. v.168, p. 1146-1153, 2002.

NAVARRETE, M.; GARCÍA, J.; DUTZAN, N.; HENRÍQUEZ, L.; PUENTE, J.; CARVAJAL, P.; HERNANDEZ, M.; GAMONAL, J. Interferon- $\gamma$ , interleukins-6 and -4, and factor XIII-A as indirect markers of the classical and alternative macrophage activation pathways in chronic periodontitis. **J Periodontol**. v.85, p.751-760, 2014.

NJOROGE, T.; GENCO, R.J.; SOJAR, H.T.; HAMADA, N.; GENCO, C A. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. **Infect Immun**. v.65, p.1980-1984, 1997.

OH, H.; HIRANO, J.; TAKAI, H.; OGATA, Y. Effects of initial periodontal therapy on interleukin-1 $\beta$  level in gingival crevicular fluid and clinical periodontal parameters. **J Oral Sci**. v.57, p.67-71, 2015.

OHLRICH, E.J.; CULLINAN, M.P.; SEYMOUR, G.J. The immunopathogenesis of periodontal disease. **Aust Dent J**. v.54, p.2-10, 2009.

OHYAMA, H.; KATO-KOGOE, N.; KUHARA, A.; NISHIMURA, F.; NAKASHO, K.; YAMANEGI, K.; YAMADA, N.; HATA, M.; YAMANE, J.; TERADA, N. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. **J Dent Res**. v.88, p.633-638, 2009.

OKADA, H; MURAKAMI, S. Cytokine expression in periodontal health and disease. **Clin Rev Oral Biol Med**. v.9, p.248-266, 1998.

OLCZAK, T.; SIMPSON, W.; LIU, X.; GENCO, C.A: Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. **FEMS Microbiol Rev**. v.29, p. 119—144, 2005.

OLCZAK, T.; SROKA, A.; POTEMPA, J.; OLCZAK, M. *Porphyromonas gingivalis* HmuY and HmuR - further characterization of a novel mechanism of heme utilization. **Arch Microbiol.** v.183, p.197-210, 2008.

OLCZAK, T.; WOJTOWICZ, H.; CIURASZKIEWICZ, J.; OLCZAK, M. Species specificity, surface exposure, protein expression, immunogenicity, and participation in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* HmuY. **BMC Microbiol.** v.10, p.134, 2010.

OLCZAK, T.; SIUDEJA, K.; OLCZAK, M. Purification and initial characterization of a novel *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein expressed in *Escherichia coli* and insect cells. **Protein Expr Purif.** v.49, p.299-306, 2006.

OPPERMANN, R.V.; WEIDLICH, P.; MUSSKOPF, M.L. Periodontal disease and systemic complications. **Braz. oral res.** v.26, p. 39-47, 2012.

OROZCO, A.; GEMMELL, E.; BICKEL, M.; SEYMOUR, G.J. Interleukin 18 and Periodontal Disease. **J Dent Res.** v.86, p.586-593, 2007.

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

PAGE, R.C.; KORNMAN K.S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol 2000.** v. 14, p. 9-11, 1997.

PAGE, R.C.; SIMPSON, D.M.; AMMONS, W. F. Host tissue response in chronic inflammatory periodontal disease. **J. Periodontol.** v.46, p.144-155, 1975.

PAPATHANASIOU, E.; TELES, F.; GRIFFIN, T.; ARGUELLO, E.; FINKELMAN, M.; HANLEY, J.; THEOHARIDES, T.C. Gingival crevicular fluid levels of interferon- $\gamma$ , but not interleukin-4 or -33 or thymic stromal lymphopoietin, are increased in inflamed sites in patients with periodontal disease. **J Periodontal Res.** v.49, p. 55-61, 2014.

PIETRUSKA, M.; ZAK, J.; WYSOCKA, J.; JAWOROWSKA, B.; ZELAZOWSKA, B.; LIPSKA, A.; STOKOWSKA, W. Evaluation of selected peripheral blood leukocyte functions in patients with various forms of periodontal disease. **Arch Immunol Ther Exp.** v.52, p.208-212, 2004.

PIHLSTROM, B. L. et al. A randomized four-year study of periodontal therapy. **J. Periodontol.** v. 52, p. 227-42, 1981.

POTEMPA, J.; SROKA, A.; IMAMURA, T.; TRAVIS, J. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. **Curr Protein Pept Sci.** v.4, p.397-407, 2003.

PRADEEP, A.R.; DAISY, H.; HADGE, P.; GARG, G.; THORAT, M. Correlation of gingival crevicular fluid interleukin-18 and monocyte chemoattractant protein-1 levels in periodontal health and disease. **J Periodontol.** v.80, p.1454-1461, 2009.

RAMFJORD, S. P. Indices for prevalence and indice of periodontal disease. **J. Periodontol.** v.30, n.1, p.51-59, 1959.

REIS, C.; DA COSTA, A.V.; GUIMARÃES, J.T.; TUNA, D.; BRAGA, A.C.; PACHECO, J.J.; AROSA, F.A.; SALAZAR, F.; CARDOSO, E.M. Clinical improvement following therapy for periodontitis: Association with a decrease in IL-1 and IL-6. **Exp Ther Med.** v.8, p.323-327, 2014.

REYNOLDS, E.C.; O'BRIEN-SIMPSON, N.; ROWE, T.; NASH, A.; MCCLUSKEY, J.; VINGADASSALOM, D.; KLEANTHOUS, H. Prospects for treatment of *Porphyromonas gingivalis*-mediated disease - immune-based therapy. **J Oral Microbiol.** v.18, p.29125, 2015.

SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, P.E.; ZAMORA-PEREZ, A.L.; FUENTES-LERMA, M.; ROBLES-GÓMEZ, C.; MARIAUD-SCHMIDT, R.P.; GUERRERO-VELÁZQUEZ, C. IL-12 and IL-18 levels in serum and gingival tissue in aggressive and chronic periodontitis. **Oral Dis.** v.17, p.522-529, 2011.

SASAKI, K.; IWAI, K. Roles of linear ubiquitinylation, a crucial regulator of NF- $\kappa$ B and cell death, in the immune system. **Immunol Rev.** v.266, p. 175-189, 2015.

SASAKI, H.; WATANABE, K.; TOYAMA, T.; KOYATA, Y.; HAMADA, N. *Porphyromonas gulae* 41-kDa fimbriae induced osteoclast differentiation and cytokine production. **J Vet Med Sci.** v.77, p.265-271, 2015.

SCHALLHORN, R.A.; PATEL, D.N.; CHANDRASEKAR, B.; MEALEY, B.L. Periodontal disease in association with systemic levels of interleukin-18 and CXC ligand 16 in patients undergoing cardiac catheterization. **J Periodontol.** v.81, p.1180-1186, 2010.



SCHENKEIN, H.A.; KOERTGE, T.E.; BROOKS, C.N.; SABATINI, R.; PURKALL, D.E.; TEW, J.G. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. **J Dent Res.** v.89, p.943-947, 2010.

SCHERES, N.; LAINE, M.L.; SIPOS, P.M.; BOSCH-TIJHOF, C.J.; CRIELAARD, W.; DE VRIES, T.J.; EVERTS, V. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. **J Periodontal Res.** v.46, p.407-416, 2011.

SEMLALI, A.; CHAKIR, J.; GOULET, J.P.; CHMIELEWSKI, W.; ROUABHIA, M. Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. **J Periodontal Res.** v.46, p.533-541, 2011.

SHYU, K.G.; CHOY, C.S.; WANG, D.C.; HUANG, W.C.; CHEN, S.Y.; CHEN, C.H.; LIN, C.T.; CHANG, C.C.; HUANG, Y.K. Change of scaling-induced proinflammatory cytokine on the clinical efficacy of periodontitis treatment. **Scientific World Journal.** 289647, 2015.

SMIGA, M.; BIELECKI, M.; OLCZAK, M.; SMALLEY, J.W.; OLCZAK, T. Anti-HmuY antibodies specifically recognize *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein but not homologous proteins in other periodontopathogens. **PLoS One.** v.10, e0117508, 2015.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.; SMITH, C.; KENT, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol.** v.25, p.134-44, 1998.

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.

TANCHAROEN, S.; MATSUYAMA, T.; KAWAHARA, K.; TANAKA, K.; LEE, L.J.; MACHIGASHIRA, M.; NOGUCHI, K.; ITO, T.; IMAMURA, T.; POTEPA, J.; KIKUCHI, K.; MARUYAMA, I. Cleavage of host cytokeratin-6 by lysine-specific gingipain induces gingival inflammation in periodontitis patients. **PLoS One.** v.10, e0117775, 2015.

TIETZE, K.; DALPKE, A.; MORATH, S.; MUTTERS, R.; HEEG, K.; NONNENMACHER, C. Differences in innate immune responses upon stimulation with

gram-positive and gram-negative bacteria. **Jornal of Periodontal Research**. v.41, p.447-454, 2006.

TONETTI, M.S.; CORTELLINI, D.; LANG, N.P. In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. **Infection and Immunity**. v.66, p.5190-5195, 1998.

TRINDADE, S.C.; GOMES-FILHO, I.S.; MEYER, R.; VALE, V.L.; PUGLIESE, L.; FREIRE, S.M. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. **J Int Acad Periodontol**. v.10, p.50-58, 2008.

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)-ip, IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. **J Periodontal Res**. v.47, p.27-32, 2012.

WALTER, C.; ZAHLTEN, J.; SCHMECK, B.; SCHAUDINN, C.; HIPPENSTIEL, S.; FRISCH, E.; HOCKE, A.C.; PISCHON, N.; KURAMITSU, H.K.; BERNIMOULIN, J.P.; SUTTORP, N.; KRÜLL, M. *Porphyromonas gingivalis* strain-dependent activation of human endothelial cells. **Infect Immun**. v.72, p.5910-5918, 2004.

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.

WOJTOWICZ, H.; GUEVARA, T.; TALLANT, et al. Unique structure and stability of HmuY, a novel heme-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*. **PLoS Pathog**. V.5: e1000419, 2009.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. **Clin Chim Acta**. v.411, p.1570-1579, 2010.

YAO, L.; JERMANUS, C.; BARBETTA, B. *Porphyromonas gingivalis* infection sequesters pro-apoptotic Bad through Akt in primary gingival epithelial cells. **Molecular oral microbiology**. v.25, p.89-101, 2010.

YEE, M.; KIM, A.; ALPAGOT, T.; DÜZGÜNEÇ, N.; KONOPKA, K. *Porphyromonas gingivalis* stimulates IL-18 secretion in human monocytic THP-1 cells. **Microbes Infect.** v.14, p.684-689, 2012.

YILMAZ, O.; JUNGAS, T.; VERBEKE, P.; OJCIUS, D.M. Activation of Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Infection and Immunity**. v.72, p.3743-3751, 2004.

YILMAZ, O.; LEE, K.L. The inflammasome and danger molecule signaling: at the crossroads of inflammation and pathogen persistence in the oral cavity. **Periodontol 2000**. v.69, p.83-95, 2015.

YILMAZ, O.; YAO, L.; MAEDA, K.; ROSE, T.M.; LEWIS, E.L.; DUMAN, M.; LAMONT, R.J.; OJCIUS, D.M. ATP scavenging by the intracellular pathogen *Porphyromonas gingivalis* inhibits P2X7-mediated host-cell apoptosis. **Cell Microbiol.** v.10, p.863-875, 2008.

YOSHIMOTO, T.; FUJITA, T.; KAJIYA, M.; MATSUDA, S.; OUHARA, K.; SHIBA, H.; KURIHARA, H. Involvement of smad2 and Erk/Akt cascade in TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis in human gingival epithelial cells. **Cytokine**. v.75, p.165-173, 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.

YOSHINAKA, K.; SHOJI, N.; NISHIOKA, T.; SUGAWARA, Y.; HOSHINO, T.; SUGAWARA, S.; SASANO, T. Increased interleukin-18 in the gingival tissues evokes chronic periodontitis after bacterial infection. **Tohoku J Exp Med**. v.232, p.215-222, 2014.

ZAINAL-ABIDIN, Z.; VEITH, P.D.; DASHPER, S.G.; ZHU, Y.; CATMULL, D.V.; CHEN, Y.Y.; HERYANTO, D.C.; CHEN, D.; PYKE, J.S.; TAN, K.; MITCHELL, H.L.; REYNOLDS, E.C. Differential proteomic analysis of a polymicrobial biofilm. **J Proteome Res**. v.11, p.4449-4464, 2012.

ZENOBIA, C.; HAJISHENGALLIS, G. Porphyromonas gingivalis virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. **Virulence**. v.6, p.236-243, 2015.

ZHAO, J.J.; FENG, X.P.; ZHANG, X.L.; LE, K.Y. Effect of *Porphyromonas gingivalis* and *Lactobacillus acidophilus* on secretion of IL1B, IL6, and IL8 by gingival epithelial cells. **Inflammation**. v.35, p. 1330-1337, 2012.

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.

ZHU, H.; LIN, X.; ZHENG, P.; CHEN, H. Inflammatory cytokine levels in patients with periodontitis and/or coronary heart disease. **Int J Clin Exp Pathol**. v.8, p.2214-2220, 2015.



Herpes		Sim		Não	Em Tratamento		Sim		Não	
--------	--	-----	--	-----	---------------	--	-----	--	-----	--

Já se submeteu a alguma destas cirurgias?

Amigdalectomia		Sim		Não		anos
Adenoidectomia		Sim		Não		anos
Apendicectomia		Sim		Não		anos
Esplenectomia		Sim		Não		anos

Já fez uso destes medicamentos pelo menos um mês/ano. Se sim qual a idade de início e qual a duração do uso?

Fenilbutazona		Sim		Não		Idade-anos		Duração-anos
Corticóide		Sim		Não		Idade-anos		Duração-anos
Indometacina		Sim		Não		Idade-anos		Duração-anos
Cloranfenicol		Sim		Não		Idade-anos		Duração-anos
Imunossupressor		Sim		Não		Idade-anos		Duração-anos
Amoxicilina		Sim		Não		Idade-anos		Duração-anos
Metronidazol		Sim		Não		Idade-anos		Duração-anos
Hormônios		Sim		Não		Idade-anos		Duração-anos

Ultima vez que foi ao Dentista				O que realizou?			
Já fez Tratamento Periodontal?				Sim		Não	Em Trat. Sim
Já fez Tratamento Ortodôntico?				Sim		Não	Em Trat. Sim
Familia com Doença Periodontal				Sim		Não	

### HÁBITOS DE HIGIENE ORAL

Quantas vezes escova seus dentes ao dia?

	1 vez
	2 vezes
	3 vezes ou +

Além da escova uso outro tipo de instrumento para limpar os dentes?

	Fio	
	palito	
	escova interdental	
	escova bitufo	
	bochechos	Qual?

O que você acha da sua condição bucal?

	Ótima
	Boa
	Ruim
	Não está preocupado com ela

Assinatura do Paciente:

Assinatura do entrevistador:



## APÊNDICE 03

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa. Antes de decidir, é importante que você entenda o porquê da realização desta pesquisa e o que ela envolve. Por favor, dedique um tempo para ler cuidadosamente as informações seguintes e se preferir, discutir com seus familiares, amigos ou com seu médico. Se você desejar, pode levar este material para casa para pensar melhor. Pergunte-nos se houver qualquer coisa que não esteja clara ou se precisar de mais informações.

A Periodontite é uma doença que se caracteriza por uma inflamação e perda do osso que envolve os dentes, levando ao amolecimento dos dentes, mau hálito e até mesmo a comprometimentos da saúde geral da pessoa. O estudo das células e moléculas envolvidas no processo inflamatório será importante para compreender melhor a atividade desta doença e os seus fatores de risco, inclusive os fatores genéticos. Os resultados nos ajudarão a ter uma melhor compreensão desta doença e poderão possibilitar um crescimento científico relacionado a este tema, inclusive influenciando na forma de prevenir e tratar esta doença.

Os objetivos deste estudo são: Estudar a expressão genética, indução de morte celular (apoptose) e atividade das células de defesa (linfócitos Treg e Th17) em Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) de indivíduos com periodontite crônica, frente ao estímulo da bactéria *Porphyromonas gingivalis*.

Serão realizados: preenchimentos de questionários com perguntas sobre sua saúde e seus hábitos de higiene da boca e exames para diagnóstico da doença periodontal realizado por dentistas (utilizando-se instrumentos apropriados para avaliar a gengiva). A coleta de sangue será feita numa sala devidamente preparada para este fim (Materiais descartáveis, esterilizados e cadeira de coleta de sangue) na mesma instituição onde será feito o exame bucal. Será coletada uma amostra de sangue (40 mL) do braço (exame de sangue) por uma pessoa integrante da equipe treinada para isso, tendo os conhecimentos necessários para essa coleta. Todo o material coletado será descartado depois de feitos os exames necessários para este projeto.

Durante a coleta de sangue você pode sentir um desconforto momentâneo, por consequência da introdução da agulha no braço. Os exames periodontais que serão realizados são exames rotineiramente efetuados por dentistas em consultórios ou serviços odontológicos. Após a coleta de sangue do seu braço, pode formar-se um hematoma (ficar um pouco roxo), mas os profissionais dispõem de meios para contornar estes efeitos indesejáveis, como a colocação de um curativo e prescrição de uma pomada (Hirudoid) para diminuir o hematoma.

Participando desta pesquisa você pode contribuir para a elaboração de um trabalho científico que poderá proporcionar benefícios futuros à sociedade. Os periodontistas envolvidos na pesquisa, juntamente com os estudantes de Odontologia que ajudarão no projeto, realizarão gratuitamente o seu tratamento periodontal. A qualquer momento, você poderá fazer perguntas sobre esta pesquisa com a garantia de que estas serão respondidas, entrar em contato com os pesquisadores e pedir que os seus dados sejam retirados da mesma, sem qualquer prejuízo para o seu atendimento em Clínicas Odontológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Os dados obtidos neste estudo serão apresentados em congressos e encontros da comunidade científica e poderão ser publicados em revistas especializadas e serão mantidos pelo pesquisador responsável, bem como pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UEFS) por um período de 05 anos na Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS. No entanto, **a sua identidade nunca será revelada.**

Caso ocorram danos à sua saúde, causados diretamente pela pesquisa, você terá direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Nenhum custo adicional será cobrado a você, pois estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Para o esclarecimento de dúvidas sobre o projeto, você pode entrar em contato com os pesquisadores Soraya Castro Trindade e Paulo Cirino de Carvalho Filho no Núcleo de Pesquisa, Prática Integrada e Investigação Multidisciplinar (*NUPPIM*) no endereço: UEFS, Av. Transnordestina s/n, Novo Horizonte, Feira de Santana, Bahia.

Antes de assinar este documento, eu fui suficientemente informado(a) sobre o projeto de pesquisa: os objetivos, os inconvenientes, os benefícios, os perigos que podem ocorrer quando eu estiver participando da pesquisa. Eu conversei diretamente com o(a) meu(minha) dentista e ele(a) respondeu todas as perguntas que fiz com relação a pesquisa sem deixar dúvidas. Eu sei que posso desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Aceito participar voluntariamente da pesquisa, permitindo que meus registros médicos sejam inspecionados por representantes da empresa que patrocina a pesquisa (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB) e por representantes do governo para conferir se o estudo está sendo realizado corretamente.

_____ Nome do(a) Paciente	_____ Assinatura ou Impressão Digital	_____ Data
_____ Nome do Investigador-principal	_____ Assinatura	_____ Data



# APÊNDICE 04

## Manuscrito 01

# ***Porphyromonas gingivalis* HmuY Evokes Inflammatory Responses in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Chronic Periodontitis Patients**

Paulo Cirino de Carvalho-Filho\*, †Márcia Tosta Xavier, §Soraya Castro Trindade

## **ABSTRACT**

**Background and Objective:** *Porphyromonas gingivalis* oral infection modulates host immune-inflammatory responses and disrupts homeostasis and the normal cell cycle, thereby leading to periodontal tissue destruction. The present study was undertaken to evaluate the production of interleukin (IL)-1b, IL-4, IL-10 and IL-18 by human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated with *P. gingivalis* antigens and to assess the mRNA expression levels of CCL2, NFKBIL1, IL-10 and IL-18 in PBMCs from patients with chronic periodontitis.

**Materials and Methods:** PBMCs from patients with chronic periodontitis (CP) and nonperiodontitis (NP) control subjects were stimulated with *P. gingivalis* HmuY. The cytokine levels in the culture supernatants were determined by ELISA, and the levels of mRNA for inflammation-related genes were evaluated using a custom real-time polymerase chain reaction array (Custom RT<sup>2</sup> PCR Array).

**Results:** No differences in the production of IL-4 and IL-1b by PBMCs stimulated with HmuY were found between the CP and NP groups. Higher levels of IL-18 were produced by HmuY in the PBMCs from the CP group and in unstimulated cells. The levels of IL-10 were significantly decreased by HmuY in the CP group, and the levels of this cytokine were also low for unstimulated cells in the CP group. Compared with the NP controls, the CCL2 mRNA of the CP patients was significantly increased in the PBMCs under HmuY stimulation, and NFKBIL1 mRNA was significantly downregulated in these cells under the same stimuli. Furthermore, there was a borderline statistical significant toward low levels of IL-10 and IL-18 mRNA expression in the PBMCs in the CP group.

**Conclusion:** HmuY from *P. gingivalis* evokes inflammatory responses in chronic periodontitis patients, eliciting CCL2 and IL-18, as well as inhibiting NFKBIL-1 and IL-10.

## **KEYWORDS**

*Porphyromonas gingivalis*; periodontitis; inflammatory responses.

## **INTRODUCTION**

*Porphyromonas gingivalis*, which is a gram-negative, non-motile, anaerobic bacterium implicated as a major pathogen in periodontal disease [1], has a variety of

\* Department of Immunology, Federal University of Bahia, Bahia, Brazil.

† Odontology Course, Bahiana School of Medicine and Public Health, Bahia, Brazil.

§Department of Periodontics, Feira de Santana State University, Bahia, Brazil.

virulence factors that are immunogenic and can stimulate both innate and adaptive host immune responses [2].

This bacteria can locally invade periodontal tissues and evade host defense mechanisms using a panel of virulence factors that disrupt the innate immune and inflammatory responses [3]. This pathogen can invade epithelial cells [4], which can be an escape mechanism from host defenses, which favors the penetration of the microorganism into the bloodstream and allows them to cause systemic infections [5].

Bacterial infection is the primary etiologic factor of periodontitis, but it is not sufficient to induce the disease onset or progression. Bacterial factors stimulate a local inflammatory reaction and activate the innate immune system. The innate response involves the recognition of microbial components by host cells, and this event can be mediated by Toll-like receptors (TLRs) expressed by the resident cells and leukocytes. Activation of these cells leads to the release of pro-inflammatory cytokines and the recruitment of phagocytes and lymphocytes. The activation of T cells initiates the adaptive immune response with Th1, Th2, Treg and Th17 cells; B cells also participate in this process by the production of antibodies [6].

Currently, many functionally distinct subsets of CD4<sup>+</sup> T cells and activated CD8<sup>+</sup> T cells have been described, and each subset expresses different cytokines and transcription factors. NF-kappaB (NFκB) is an important transcription factor complex that plays a key role in the regulation of acute inflammation through the cascade activation of cytokines and the production of other proinflammatory mediators [7, 8, 9]. The activation of NFκB can be inhibited by NFKBIL1 [10] and the inhibitory protein κB-like (IκBL), which is encoded by HLA-NFKBIL1 and is a protein of unknown function. Genetic variations in NFKBIL1 are associated with susceptibility to inflammatory and autoimmune diseases [11].

Modern profiles of cytokines and analyses of transcription factors have led to more detailed classification of T helper cells; the profiles Th17, Th1, Th9, and Th22 cells are altered in periodontal diseases [12, 13, 14, 15, 16, 17]. Effector T cells may become naive, recently activated, or memory T cells that can be distinguished by cell surface markers [18].

Recently, several studies have also shown a close relationship between increased levels of interleukin-18 (IL-18) and the pathogenesis of chronic periodontitis [19, 20, 21,

22, 23, 24]. IL-18 is a potent proinflammatory cytokine with structural similarity to IL-1beta [25]. In the presence of IL-12, IL-18 induces Th1 responses, whereas in the absence of IL-12, Th2 responses are promoted. Therefore, IL-18 has the ability to induce differentiation into Th1 or Th2 cells [26].

T cells also secrete pro-resorptive cytokines, such as IL-1, IL-6 and IL-17, and each of these cytokines stimulates the expression of receptor activator of NFκB ligand (RANKL) in osteoblasts and fibroblasts, which promotes osteoclast formation in a contact-dependent process. CD4<sup>+</sup> IL-17-producing cells are designated as a subpopulation of Th17 cells and express TNF, IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). These cells are responsive to IL-23, which controls cell expansion and survival [27].

The microenvironment of the periodontal lesion may also include IL-10, which affects various cell types, including T cells, B cells, macrophages, NK cells, mast cells and neutrophils. The negative effects of IL-10 include modulation of IL-1, IL-8, IL-12 and TNF-α and inhibition of phagocytosis [28].

T regulatory cells (Treg) [29, 30] and Th17 cells [31, 32] have been identified in periodontal tissues, suggesting the importance of immunoregulation in periodontal disease. The clinical implications of these studies can be seen in the identification of Th1/Th2 and Treg/Th17 genes in peripheral blood and salivary transcriptomes that are now being tested as possible susceptibility markers for disease [33].

In this pro-inflammatory process, the ability of *Porphyromonas gingivalis* to evade the host immune response and access nutrients in the microenvironment is directly related to their survival, proliferation and infection. Iron is one of essential nutrients for the development of these bacteria. Iron is most abundant in the host in the form of hemin [34]. According to Olczak et al. [35], HmuY may be the first reported member of a class of proteins in *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides* species involved in heme capture. The function of HmuY is to bind heme and transfer it to its cognate membrane receptor, HmuR [36, 37].

Recent studies show a syntropy among species of the oral biofilm, revealing interspecies cooperation in the acquisition of nutrients. This mechanism reveals how HmuY works together with a protease from other bacterial species to acquire heme in hemoglobin and may represent mutualism between *Porphyromonas gingivalis* and

*Prevotella intermedia* co-inhabiting the periodontal pocket [38]. However, antibodies directed against *P. gingivalis* HmuY are highly specific for the purified protein and cell-bound HmuY, suggesting that this protein can serve as a specific antigen for serum antibodies directed against this bacterium [39].

The immunogenic potential of HmuY of *Porphyromonas gingivalis* has been shown, demonstrating the ability of this protein to promote inflammation and induce high levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 [40, 41]. Furthermore, HmuY seems to participate in a delayed response to the increase in IL-10, anti-HmuY IgG and IgG1 levels and the inhibition of IL-8 production in patients with chronic periodontitis [40] and high IL-6 production [41]. Despite its potential virulence, the role of HmuY protein in stimulating the immune response is not well established.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Patients and control participants***

A total of 20 patients with severe chronic periodontitis (CP) and 26 control subjects without periodontitis (NP) were recruited between 2013 and 2014 from the College of Dentistry at Feira de Santana State University. The following exclusion criteria were established: presence of diabetes, cardiovascular disease, pregnancy, auto-immune disease, tobacco use, prior periodontal treatment, use of anti-inflammatory drugs within two months prior to inclusion and antibiotic drug use within six months of the study. The study was approved by the Feira de Santana State University Institutional Review Board (No. 0203.0.059.000-11). All volunteers in this study signed the free and informed consent form.

### ***Disease classification***

Periodontal examination was performed by a single, previously trained examiner (P.C.C.F.) (kappa interexaminer agreement value = 0.932) using a Williams periodontal probe (Hu Friedy, Chicago, IL, USA). The following clinical parameters were evaluated: probing depth (PD), clinical attachment level (CAL) and bleeding on probing (BOP). The examiner was blinded to the statuses of the participants at the time of clinical periodontal examination.

Participants were diagnosed as having periodontitis (group CP) if they had at least four teeth with at least one site with a probing depth greater than or equal to 4 mm, clinical attachment loss of 3 mm or more and bleeding on probing at the same site [42]. Those participants who did not meet these criteria were considered not to have periodontitis (group NP).

Participants were also classified with severe periodontitis if they had at least 2 interproximal sites with clinical attachment loss greater than or equal to 6 mm (not affecting the same tooth) and at least 1 interproximal site with a probing depth greater than or equal to 5 mm [43].

### ***Antigen***

The *P. gingivalis* HmuY polypeptide lacking the first 25 residues (NCBI accession no. CAM 31898) was overexpressed using the plasmid pHmuY11 and *Escherichia coli* ER2566 cells (New England Biolabs, MA, USA) and was purified from the soluble fraction of *E. coli* lysate, as previously described [44]. Contaminating endotoxins were removed from the HmuY sample using Detoxi-Gel Endotoxin Removing Columns (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). HmuY was prepared at a final concentration of 2.5 µg/mL.

### ***Blood collection and cell culture***

Twenty milliliters of peripheral venous blood were drawn from each individual and collected in heparin tubes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from these blood samples and purified by density centrifugation in accordance with the manufacturer's guidelines (Ficoll-Paque, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). All cells were washed twice in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium (LGCBio, São Paulo, SP, Brazil), and PBMCs were cultured in flat-bottom 24-well plates (106 cells/well) in RPMI medium containing 10% fetal calf serum (complement proteins inactivated by heat) and 1% antibiotic/antimycotic solution (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). All cultures were grown for 48 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in humid conditions. Cells were also incubated with 5 µg/mL of pokeweed mitogen (PWM) as a positive control, 2.5 µg/mL of *Porphyromonas gingivalis* rHmuY, or in the absence of antigens (cells).

### ***Cytokine quantification***

After cell culture, the supernatants were collected by centrifugation and tested in duplicate to determine IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 and IL-18 levels by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

### ***Gene expression***

The total RNA was isolated from 10<sup>6</sup> cells using the miRNeasy Mini kit (QIAGEN, Valencia, California, USA) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of the total RNA using the RT<sup>2</sup> First Strand Kit (SABiosciences, Frederick, MD, USA), which includes the additional removal of genomic DNA from the RNA sample and a specific control of reverse transcription.

The samples were analyzed using the Custom Human RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array CAPH12794 (SABiosciences, Frederick, MD, USA), which was specifically designed for this study. Altogether, 45 different genes were simultaneously amplified in the sample. A melting curve analysis was performed to verify that the product consisted of a single amplicon.

PCR arrays were performed in 384-well plates on an Applied Biosystems<sup>TM</sup> QuantStudio<sup>TM</sup> 12K Flex Real-Time PCR System 384-well block (Applied Biosystems). Briefly, the reaction mix was prepared from 2x SABiosciences RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix and 102  $\mu$ L of sample cDNA. Ten microliters of this mixture was added to each well of the PCR array. The data were analyzed via Applied Biosystems software, and the Ct values were extracted for each gene. The thresholds and baselines were set according to the manufacturer's instructions (SABiosciences, Qiagen).

### ***Statistical analysis***

The data were analyzed using software supplied by Qiagen (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). The software identified glucuronidase beta (GUSB) as the most stably expressed housekeeping gene for data normalization. The fold change in gene expression (compared with the positive control – PBMC – CP group) was calculated using the  $\Delta\Delta$ Ct method. A more than two-fold change in gene expression (compared with the positive control – PBMC – CP group) was considered to be up- or downregulation of the expression of a specific gene.

The RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis software does not perform any statistical analysis beyond the calculation of p-values using Student's t-test based on the 2<sup>-ΔCT</sup> values for each gene in the CP group compared with the SP group. The Microarray Quality Control (MAQC) published results indicating that a ranked list of genes based on fold-change and a p-value calculation was sufficient to demonstrate reproducible results across multiple microarray and PCR arrays, including the RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays [45, 46].

## RESULTS

The periodontitis patients and healthy subjects were comparable regarding gender, age and number of teeth, as shown in Table 1. As expected, periodontal conditions were worse in the periodontitis patients.

**Table 1:** Clinical findings of control subjects without periodontitis (NP) and patients with chronic periodontitis (CP)

	NP	CP	P
<b>Number of Men/Women</b>	17/9	13/7	0.958
<b>Age (years) (Mean ± SD)</b>	37.92 ± 10.8	41.95 ± 9.7	0.565
<b>% BOP (Mean ± SD)</b>	8.45 ± 10.7	37.97 ± 16.9	0.028
<b>% PD ≥ 4 (Mean ± SD)</b>	1.23 ± 1.84	14.93 ± 8.91	0.000
<b>% CAL ≥ 3 (Mean ± SD)</b>	19.60 ± 15.53	57.04 ± 17.25	0,000
<b>% CAL ≥ 5 (Mean ± SD)</b>	2.45 ± 6.19	14.28 ± 13.93	0.000

**SD, Standard Deviation; BOP, Bleeding on Probing; PD, Probing Depth; CAL, Clinical Attachment Loss.**

### *Cytokine production by PBMCs*

The levels of interleukin-1β (IL-1β), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) and interleukin-18 (IL-18) produced by the PBMCs were measured by ELISA, and the differences between groups were analyzed according to the stimulus used during culture.

- *IL-1β*



No statistically significant differences were observed in IL-1 $\beta$  levels between the CP and NP groups when cells were cultured without stimulation ( $p = 0.506$ ) or in the presence of Pokeweed mitogen ( $p = 0.319$ ) or rHmuY protein ( $p = 0.973$ ) (Figure 1A).

- *IL-4*

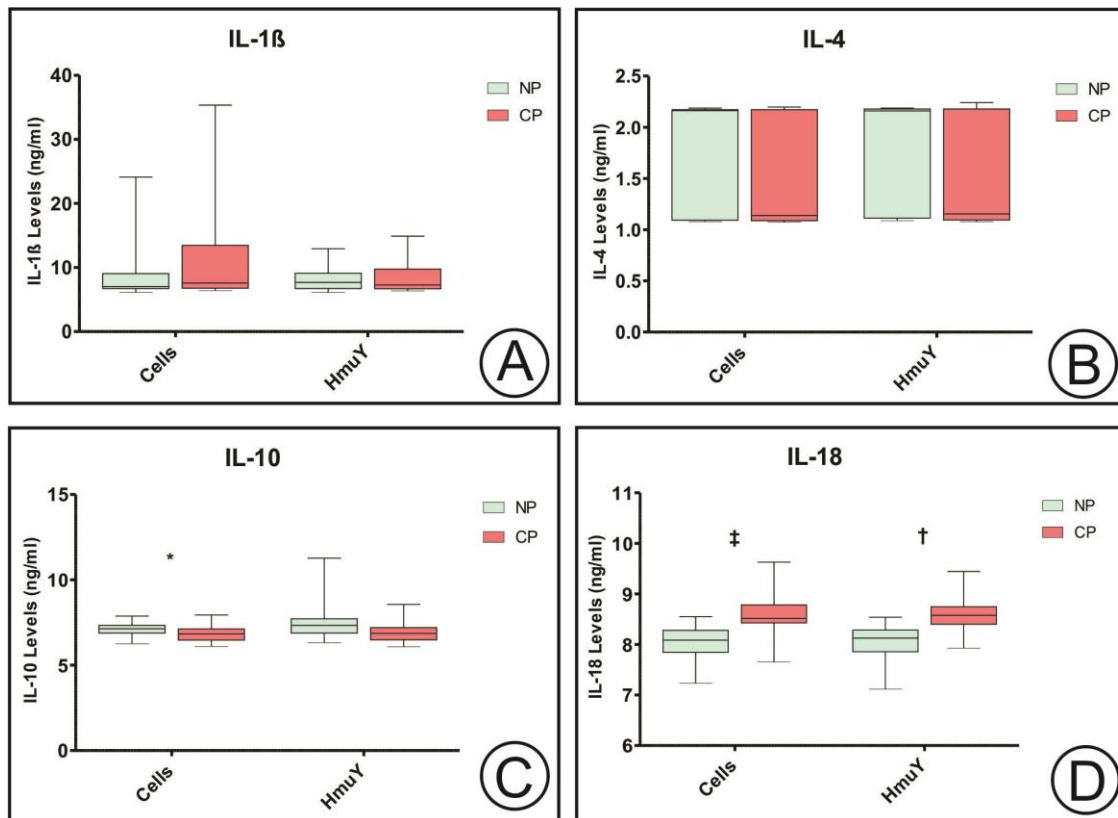
No statistically significant differences were observed in IL-4 levels between the CP and NP groups when cells were cultured without stimulation ( $p = 0.168$ ) or in the presence of Pokeweed mitogen ( $p = 0.325$ ) or rHmuY protein ( $p = 0.096$ ) (Figure 1B).

- *IL-10*

The results showed lower levels of IL-10 secreted by the PBMCs from individuals in the CP group compared with the levels secreted by the cells from individuals in the NP group when the cells were cultured without stimulation (B) ( $p = 0.034$ ). However, in the presence of Pokeweed mitogen ( $p = 0.184$ ) or rHmuY protein ( $p = 0.051$ ), no significant differences were observed between the groups (Figure 1C).

- *IL-18*

Higher levels of IL-18 were observed in the PBMCs from individuals in the CP group compared with the cells from individuals in the NP group for cells cultured with rHmuY ( $p = 0.000$ ) and for cells cultured without stimulation ( $p = 0.000$ ) (Figure 1D).

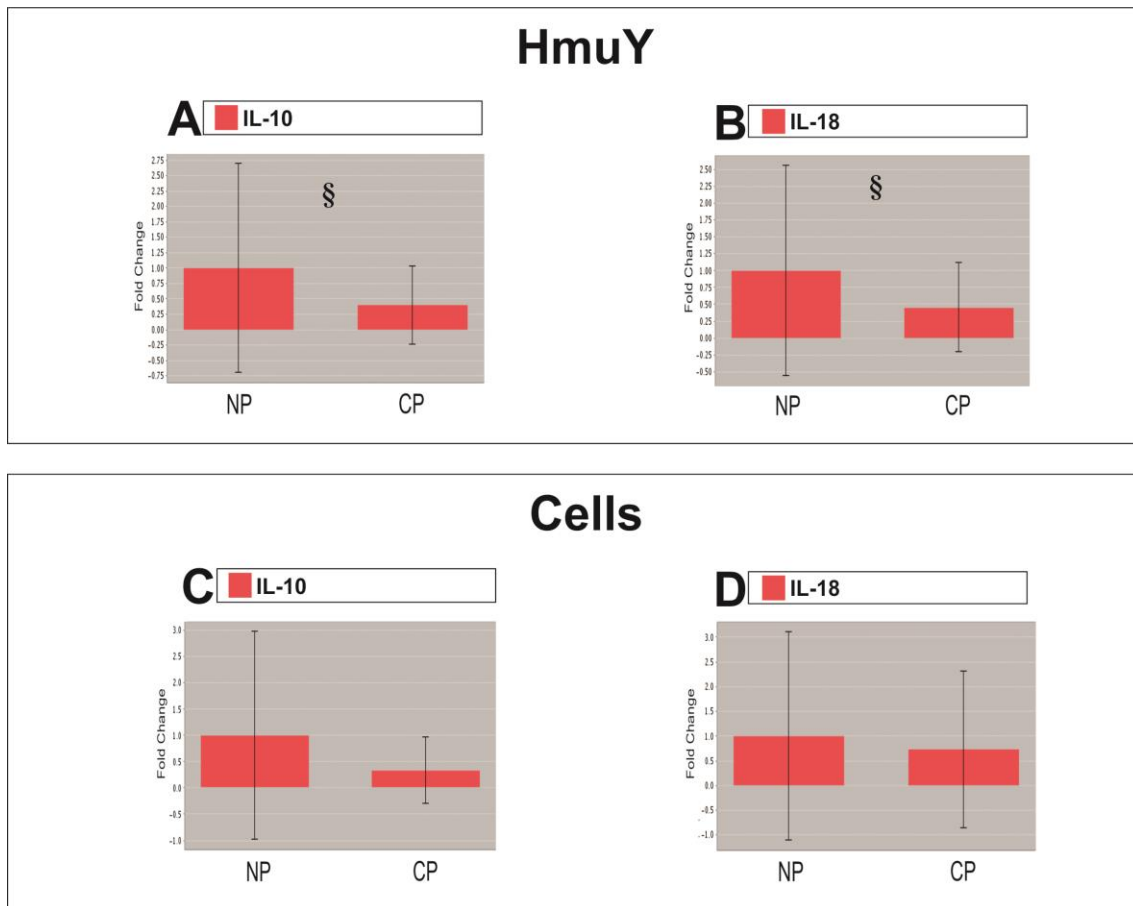


**Figure 01:** Production of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (A), interleukin-4 (IL-4) (B), interleukin-10 (IL-10) (\* $p = 0.034$ ) (C) and interleukin-18 (IL-18) ( $\ddagger p = 0.000$  and  $\dagger p = 0.000$ ) (D) in peripheral blood mononuclear cells culture supernatants from individuals without periodontitis (NP) and chronic periodontitis (CP).

### *Gene expression analysis*

#### *Cytokine-related gene expression in PBMCs of periodontal patients*

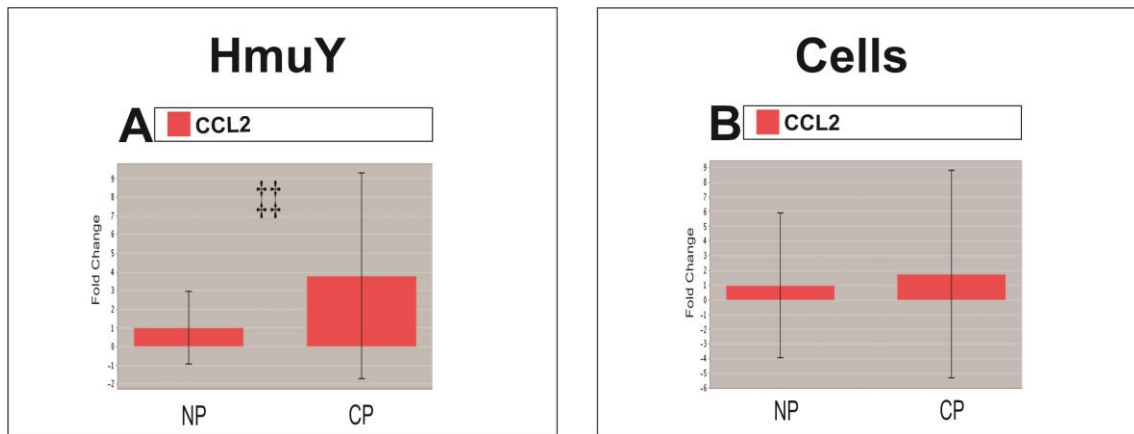
We observed downregulation and lower levels of fold change for IL-10 and IL-18 in the PBMCs of the CP group subjects compared with the levels of fold change for these molecules in the cells of the NP group subjects when the cells were stimulated with rHmuY. The differences between the groups showed borderline statistical significance for IL-10 and IL-18 ( $0.05 < \S p < 0.1$ ) (Figure 2, A and B). There were no statistically significant differences in IL-10 and IL-18 expression levels for the unstimulated cells between the CP and NP groups (Figure 2, C and D).



**Figure 02:** IL-10 and IL-18 mRNA expression in the unstimulated and *P. gingivalis* HmuY-stimulated PBMCs from the NP and PC groups. A-D. Functional groups of genes involved in inflammation that are downregulated with borderline significance ( $0.05 < §p < 0.1$ ) in the PBMCs from the CP group.

#### *CCL2 gene expression in PBMCs of periodontal patients*

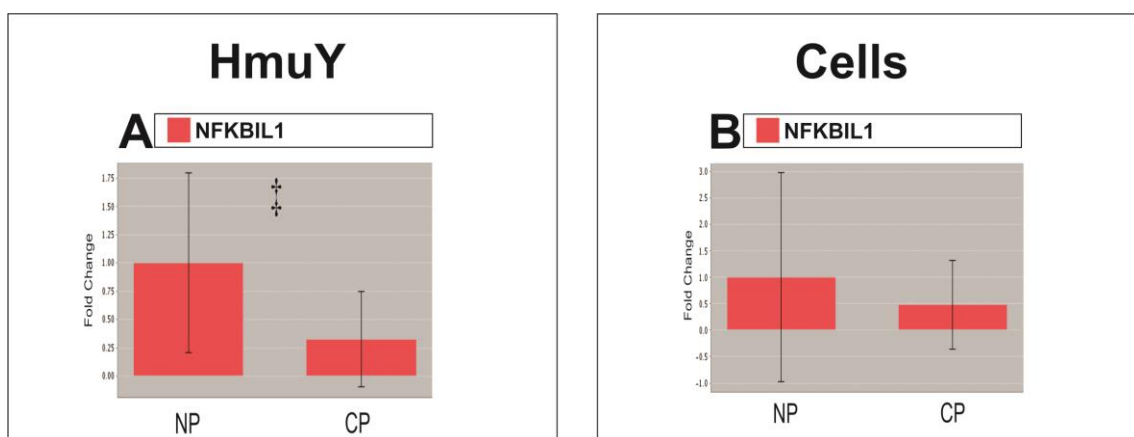
We observed upregulation and high fold changes for CCL-2 in the PBMCs from the CP group subjects compared with the levels of this molecule in the cells from the NP group subjects when the cells were cultured under rHmuY stimulation ( $p = 0.0245$ ) (Figure 3, A). There was no statistically significant difference in CCL2 expression levels in the unstimulated cells from the CP and NP groups (Figure 3, B).



**Figure 03:** CCL2 mRNA expression in the *P. gingivalis* HmuY-stimulated and unstimulated PBMCs from the NP and PC groups. A-B. Functional groups of genes involved in chemotaxis that are significantly upregulated ( $p = 0.0245$ ) in the PBMCs from the CP group.

#### *NFKBIL1* gene expression in PBMCs from periodontal patients

WE observed significant downregulation and low levels of fold change for NFKBIL1 in the PBMCs from the CP group subjects compared with the levels of the same molecule produced by the cells from the NP group subjects when the cells were stimulated with rHmuY ( $p = 0.0358$ ) (Figure 4, A). There was no statistically significant difference in NFKBIL1 expression levels in the unstimulated cells from the CP and NP groups (Figure 4, B).



**Figure 04:** NFKBIL1 mRNA expression in the *P. gingivalis* HmuY-stimulated and unstimulated PBMCs from the NP and PC groups. A-B. Functional groups of genes involved in NF $\kappa$ B pathway inhibition that are significantly downregulated ( $p = 0.0358$ ) in the PBMCs from the CP group.

## DISCUSSION

The increased production of IL-18 in the group with chronic periodontitis by PBMC stimulated by rHmuY of *P. gingivalis* and also by unstimulated cells may indicate a proinflammatory profile in individuals with chronic periodontitis and its role in the immunopathogenesis of the disease. However IL-18 production profile was similar in both rHmuY stimulated cells, as the PBMCs without antigen stimulation, suggesting that HmuY was not able to alter IL-18 levels in both groups.

There is few studies addressing the involvement of IL-18 in mediating the host response to periodontal pathogens and associated tissue damage [54, 55, 56], differently of IL-1 $\beta$ , whose role in the periodontitis pathogenesis is supported by a lot of data [47, 48, 49, 50, 51, 52, 53]. Our data showed no statistically significant differences in relation to IL-1 $\beta$  production by PBMC between groups, NP and CP, when stimulated by HmuY. In another study it was demonstrated high IL-1 $\beta$  production by cells from patients with chronic periodontitis cultured with this same stimulus [40]. Furthermore, in this study there was secretion of IL-18 increased in the culture supernatants of the PBMC of patients with chronic periodontitis compared to the non periodontitis group, for both unstimulated and under stimulated with rHmuY. A plausible explanation for this finding is that although IL-1- $\beta$  and IL-18 belonging to the same family of cytokines, their gene expression and secretion are regulated differently in response to *Porphyromonas gingivalis*, as demonstrated by Hamedi *et al.* [62] a study evaluating the production and expression of these cytokines in human monocytes.

It was also examined the production of interleukin-4 which is an important cytokine that is characteristic of a Th2 profile, considered protective in relation to periodontitis [57, 58], as well as IL-10 also have protective action periodontal tissues to modulate and regulate the production of proinflammatory cytokines [59, 60, 61]. The decreased production of IL-10 in CP group suggests an impaired secretion of a cytokine that could modulate and regulate the inflammatory process. The study by Navarrete, et al [65] showed an increase in IL-4 levels produced by macrophages in gingival tissue biopsies of patients with chronic periodontitis compared with these same cell types in healthy individuals. Probably, in our study, the evaluation of IL-4 in peripheral blood was not enough to detect the differences in this cytokines between the groups. Regarding to IL-10 results, the data of the present study is not in agreement with Trindade et al. [40], who found higher levels of IL-10 in chronic periodontitis patients.

Data on mRNA expression of IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 and IL-18 showed no statistically significant differences between the PBMC of NP and CP groups with rHmuY of Pg stimulation and without stimulation. However IL-10 and IL-18 exhibited a borderline significance, with these genes downregulated the groups with chronic periodontitis, both for unstimulated PBMC, and for cells stimulated with rHmuY. This is due, possibly by decreasing the number of individuals in the composition of NP and CP groups to conducting this test, which also diminished the power of the analysis. Ebersole et al. [60] in a study with rhesus monkeys showed that mRNA for IL-18 was downregulated in the initiation phase and progression of periodontitis and the expression of mRNA for IL-10 was upregulated in resolution phase of the disease.

Also there were no significant differences between the NP and CP groups in gene expression and IL-4 release in PBMC culture supernatants. The study Pietruska, et al. [63] showed no significant differences between IL-4 levels produced by PBMC from patients with tapered and aggressive periodontitis compared with healthy individuals. However BAEK, et al. [64] found an increased expression of IL-4 by gingival fibroblasts (FG) from healthy individuals in the absence and presence of *P. gingivalis* compared to FG subjects with periodontitis.

mRNA expression for CCL-2 was upregulated in PBMC of CP group under *P. gingivalis* rHmuY stimulate. Thus, was demonstrated HmuY capacity for induce high levels of this chemokine coding gene. The encoded chemokine by this gene is also known as chemotactic protein-1 monocytes (MCP-1), being a potent chemokine that attracts monocytes and macrophages. MCP-1 is a member of the CC chemokine subfamily and its effects are exerted by binding to receptors linked to G protein on the surface of white blood cells, aiming at the activation and migration of these cells [68]. The study Pradeep et al. [69], by evaluating the production of cytokines and chemokines in the gingival fluid, it revealed a positive correlation between IL-18 and MCP-1, noting increased concentrations of periodontal disease in Compared with healthy control and also a positive correlation with disease severity. Maeda et al. [69], suggested that activation of the MyD88 the low level of IL-1 $\beta$  constitutive expression is essential to induce the expression of CCL2 and CXCL2 in osteoblasts.

The study results showed downregulation of mRNA expression for NFKBIL1 in PBMC of individuals PC group under stimulus rHmuY of *P. gingivalis*. This finding suggests that HmuY can reduce even the transcriptional level of mRNA expression for NFKBIL1, gene this one that is implicated in negative modulation of the activation of the NF- $\kappa$ B pathway, which could facilitate the expression of pro-inflammatory protein coding genes including cytokines, chemokines and adhesion molecules in this way.

This finding corroborates the study de Scheres et al. [66] found that low levels of expression in NFKBIL1 gingival fibroblasts and periodontal ligament before and after challenge in vitro with *Porphyromonas gingivalis*. Thus, Based on the limited homology with members of the inhibitor of NF $\kappa$ B (IkBL), this has been included as a protein family inhibitor member NF $\kappa$ B, but another role has also been proposed, for involvement in mRNA processing and regulation of translation [67].

The literature is still incipient in the study of the expression of genes related to inflammatory mechanisms, which makes our study, an important contribution to the understanding of the interaction between pathogen and host at the beginning and progression of periodontitis. However, the sample size involving gene expression is generally limited and may compromise the power analysis. Thus, although our findings demonstrate the ability of *Porphyromonas gingivalis* HmuY to evoke the inflammatory response for induces inflammation in periodontal tissues, future studies are needed to examine the escape mechanisms of this pathogen to evade the host immune system.

## **CONCLUSIONS**

Our data suggest that the protein HmuY of *P. gingivalis* evokes inflammatory responses in periferal blood mononuclear cells of chronic periodontitis patients, eliciting CCL2 and IL-18, as well as inhibiting NFKBIL-1 and IL-10.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by grant no. APP019/2011 from the Research Support Foundation of the State of Bahia (Soraya Trindade) and by a student fellowship from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel in Brazil (awarded to Paulo Cirino de Carvalho Filho). The authors would like to thank the Laboratory of

Immunology and Molecular Biology and Laboratory Allergy and Acarology at the Health Sciences Institute of the Federal University of Bahia (UFBA).

## REFERENCES

1. Nakayama K. *Porphyromonas gingivalis* and related bacteria: from colonial pigmentation to the type IX secretion system and gliding motility. *J Periodontal Res* 2015; 50:1-8.
2. Zenobia C, Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence* 2015; 6:236-243.
3. Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett* 2012; 333:1-9.
4. Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CA. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect Immun* 1997; 65:1980-1984.
5. Walter C, Zahlten J, Schmeck B, Schaudinn C, Hippenstiel S, Frisch E, Hocke AC, Pischon N, Kuramitsu HK, Bernimoulin JP, Suttorp N, Krüll M. *Porphyromonas gingivalis* strain-dependent activation of human endothelial cells. *Infect Immun* 2004; 72:5910-5918.
6. Benedetto AB, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal Disease: Linking the Primary Inflammation to Bone Loss. *Clin Dev Immunol* 2013; 503754.
7. Fujita Y, Nakayama M, Naito M, Yamachika E, Inoue T, Nakayama K, Iida S, Ohara N. Hemoglobin receptor protein from *Porphyromonas gingivalis* induces interleukin-8 production in human gingival epithelial cells through stimulation of the mitogen-activated protein kinase and NF- $\kappa$ B signal transduction pathways. *Infect Immun* 2014; 82:202-211.
8. Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Intensive Care Med* 1998; 24:1131-1138.
9. Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14:436-441.



10. Atzei P, Gargan S, Curran N, Moynagh PN. Cactin targets the MHC class III protein I kappa B-like (IkappaBL) and inhibits NF-kappa B and interferon-regulatory factor signaling pathways. *J Biol Chem* 2010; 19:36804-36817.
11. An J, Nakajima T, Shibata H, Arimura T, Yasunami M, Kimura A. A novel link of HLA locus to the regulation of immunity and infection: NFKBIL1 regulates alternative splicing of human immune-related genes and influenza virus M gene. *J Autoimmun* 2013; 47:25-33.
12. Chen XT, Tan JY, Lei LH, Chen LL. Cytokine levels in plasma and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis. *Am J Dent* 2015; 28:9-12.
13. Moretti S, Bartolommei L, Galosi C, Renga G, Oikonomou V, Zamparini F, Ricci G, Borghi M, Puccetti M, Piobbico D, Eramo S, Conti C, Lomurno G, Bartoli A, Napolioni V, Romani L. Fine-tuning of Th17 Cytokines in Periodontal Disease by IL-10. *J Dent Res* 2015; 94:1267-1275.
14. Kong F, Zheng D, She P, Ni P, Zhu H, Xu H, Su Z. *Porphyromonas gingivalis* B cell Antigen Epitope Vaccine, pIRES-ragB'-mGITRL, Promoted RagB-Specific Antibody Production and Tfh Cells Expansion. *Scand J Immunol* 2015; 81:476-482.
15. Luo Z, Wang H, Wu Y, Sun Z, Wu Y. Clinical significance of IL-23 regulating IL-17A and/or IL-17F positive Th17 cells in chronic periodontitis. *Mediators Inflamm* 2014; 627959.
16. Araujo-pires AC, Francisconi CF, Biguetti CC, Cavalla F, Aranha AM, Letra A, Trombone AP, Faveri M, Silva RM, Garlet GP. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci* 2014; 22:336-346.
17. Arun KV, Talwar A, Kumar TS. T-helper cells in the etiopathogenesis of periodontal disease: A mini review. *J Indian Soc Periodontol* 2011; 15:4-10.
18. Hall BM. T Cells: Soldiers and Spies-The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 06620714.
19. Chitrapriya MN, Rao SR, Lavu V. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in different stages of inflammatory periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol* 2015; 19:14-17.

20. Banu S, Jabir NR, Mohan R, Manjunath NC, Kamal MA, Kumar KR, Zaidi SK, Khan MS, Tabrez S. Correlation of Toll-like receptor 4, interleukin-18, transaminases, and uric acid in patients with chronic periodontitis and healthy adults. *J Periodontol* 2015; 86:431-439.
21. Yoshinaka K, Shoji N, Nishioka T, Sugawara Y, Hoshino T, Sugawara S, Sasano T. Increased interleukin-18 in the gingival tissues evokes chronic periodontitis after bacterial infection. *Tohoku J Exp Med* 2014; 232:215-222.
22. Schallhorn RA, Patel DN, Chandrasekar B, Mealey BL. Periodontal disease in association with systemic levels of interleukin-18 and CXCL16 in patients undergoing cardiac catheterization. *J Periodontol* 2010;81:1180-1186.
23. Sánchez-Hernández PE, Zamora-Perez AL, Fuentes-Lerma M, Robles-Gómez C, Mariaud-Schmidt RP, Guerrero-Velázquez C. IL-12 and IL-18 levels in serum and gingival tissue in aggressive and chronic periodontitis. *Oral Dis* 2011; 17:522-529.
24. Yee M, Kim A, Alpagot T, Düzgüneş N, Konopka K. *Porphyromonas gingivalis* stimulates IL-18 secretion in human monocytic THP-1 cells. *Microbes Infect* 2012; 14:684-689.
25. Hamed M, Belibasakis GN, Cruchley AT, Rangarajan M, Curtis MA, Bostanci N. *Porphyromonas gingivalis* culture supernatants differentially regulate Interleukin-1 $\beta$  and Interleukin-18 in human monocytic cells. *Cytokine* 2009; 45:99–104.
26. Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin 18 and Periodontal Disease. *J Dent Res* 2007; 86:586-593.
27. Gillespie MT. Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function. *Arthritis Research & Therapy* 2007; 9:103-106.
28. Murray DA, Wilton JMA. Lipopolysaccharide from the Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis* Prevents Apoptosis of HL60-Derived Neutrophils In Vitro. *Infection and Immunity* 2003; 71:7232-7235.
29. Nakajima T, Ueki-Maruyama K, Oda T, Ohsawa Y, Ito H, Seymour GJ, Yamazaki K. Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *J Dent Res* 2005; 84:639-643.

30. Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Júnior WM, Rossi MA, Silva JS. Characterization of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol* 2008; 84:311-318.
31. Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamane J, Terada N. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res* 2009; 88:633-638.
32. Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res* 2010; 89:943-947.
33. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J* 2009; 54:2-10.
34. Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco CA: Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29:119–144.
35. Olczak T, Sroka A, Potempa J, Olczak M: *Porphyromonas gingivalis* HmuY and HmuR – further characterization of a novel mechanism of heme utilization. *Arch Microbiol* 2008; 183:197–210.
36. Olczak T, Siudeja K, Olczak M. Purification and initial characterization of a novel *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein expressed in *Escherichia coli* and insect cells. *Protein Expr Purif* 2006;49:299-306.
37. Wojtowicz H, Guevara T, Tallant C, et al. Unique structure and stability of HmuY, a novel heme-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS Pathog* 2009;5: e1000419.
38. Byrne DP, Potempa J, Olczak T, Smalley JW. Evidence of mutualism between two periodontal pathogens: co-operative haem acquisition by the HmuY haemophore of *Porphyromonas gingivalis* and the cysteine protease interpain A (InpA) of *Prevotella intermedia*. *Mol Oral Microbiol* 2013; 28:219-29.
39. Śmiga M, Bielecki M, Olczak M, Smalley JW, Olczak T. Anti-HmuY antibodies specifically recognize *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein but not homologous proteins in other periodontopathogens. *PLoS One* 2015; 10:e0117508.
40. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Cerqueira EM, Galdino-Neto M, Alves H, Carvalho-Filho PC, Xavier MT, Meyer R. Induction of interleukin

- (IL)-1 $\beta$ , IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. *J Periodontal Res* 2012; 47:27-32
41. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, de Moura-Costa LF, Vale VC, Galdino-Neto M, Alves Dos Santos H, de Carvalho Filho PC, Stocker A, Bendicho MT, Xavier MT, de Moraes Marcílio Cerqueira E, Meyer R. Porphyromonas gingivalis HmuY-induced production of interleukin-6 and IL-6 polymorphism in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2013; 84:650-655.
  42. Gomes-Filho IS, Cruz SS, Rezende EC, et al: Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol* 2007; 34:957–963.
  43. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol* 2007; 78:1387-1399.
  44. Olczak T, Wojtowicz H, Ciuraszkiewicz J, Olczak MR: Species specificity, surface exposure, protein expression, immunogenicity, and participation in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* HmuY. *BMC Microbiol* 2010; 10:134.
  45. Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1151–1161.
  46. Shi L, Campbell G, Jones WD, Campagne F, Wen Z, Walker SJ, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC)-II study of common practices for the development and validation of microarray-based predictive models. *Nat Biotechnol* 2010; 28:827–838.
  47. Oh H, Hirano J, Takai H, Ogata Y. Effects of initial periodontal therapy on interleukin-1 $\beta$  level in gingival crevicular fluid and clinical periodontal parameters. *J Oral Sci* 2015; 57:67-71.
  48. Ling MR, Chapple IL, Matthews JB. Peripheral blood neutrophil cytokine hyper-reactivity in chronic periodontitis. *Innate Immun* 2015; 21:714-725.
  49. Zhu H, Lin X, Zheng P, Chen H. Inflammatory cytokine levels in patients with periodontitis and/or coronary heart disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8:2214-2220.

50. Shyu KG, Choy CS, Wang DC, Huang WC, Chen SY, Chen CH, Lin CT, Chang CC, Huang YK. Change of scaling-induced proinflammatory cytokine on the clinical efficacy of periodontitis treatment. *ScientificWorldJournal*. 2015; 2015:289647.
51. Sasaki K, Iwai K. Roles of linear ubiquitylation, a crucial regulator of NF- $\kappa$ B and cell death, in the immune system. *Immunol Rev* 2015; 266:175-189.
52. Lam RS, O'brien-Simpson NM, Lenzo JC, Holden JA, Brammar GC, Walsh KA, Mcnaughtan JE, Rowler DK, Van Rooijen N, Reynolds EC. Macrophage depletion abates *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone resorption in mice. *J Immunol* 2014; 193:2349-2362.
53. Reis C, Da Costa AV, Guimarães JT, Tuna D, Braga AC, Pacheco JJ, Arosa FA, Salazar F, Cardoso EM. Clinical improvement following therapy for periodontitis: Association with a decrease in IL-1 and IL-6. *Exp Ther Med* 2014; 8:323-327.
54. Yilmaz Ö, Lee KL. The inflammasome and danger molecule signaling: at the crossroads of inflammation and pathogen persistence in the oral cavity. *Periodontol 2000* 2015; 69:83-95.
55. Yoshinaka K, Shoji N, Nishioka T, Sugawara Y, Hoshino T, Sugawara S, Sasano T. Increased Interleukin-18 in the Gingival Tissues Evokes Chronic Periodontitis after Bacterial Infection. *Tohoku J. Exp* 2014; 232:215-222.
56. Yee M, Kim A, Alpagot T, Düzgüneş N, Konopka K. *Porphyromonas gingivalis* stimulates IL-18 secretion in human monocytic THP-1 cells. *Microbes Infec* 2012; 14:684-689.
57. Reynolds EC, O'brien-Simpson N, Rowe T, Nash A, Mccluskey J, Vingadassalom D, Kleanthous H. Prospects for treatment of *Porphyromonas gingivalis*-mediated disease - immune-based therapy. *J Oral Microbiol* 2015; 18:29125.
58. Behfarnia P, Birang R, Pishva SS, Hakemi MG, Khorasani MM. Expression levels of th-2 and th-17 characteristic genes in healthy tissue versus periodontitis. *J Dent* 2013; 10:23-31.
59. Lewkowicz N, Mycko MP, Przygodzka P, Ćwiklińska H, Cichalewska M, Matysiak M, Selmaj K, Lewkowicz P. Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. *Mucosal Immunol* 2015; 29.

60. Ebersole JL, Kirakodu S, Novak MJ, Stromberg AJ, Shen S, Orraca L, Gonzalez-Martinez J, Burgos A, Gonzalez OA. Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2014; 41:853-861.
61. Jin Y, Wang LY, Lin XP. Detection and the immune status of regulatory T cells in experimental periodontitis. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2013; 22:487-491.
62. Hamed M, Belibasakis GN, Cruchley AT, Rangarajan M, Curtis MA, Bostanci N. *Porphyromonas gingivalis* culture supernatants differentially regulate Interleukin-1b and Interleukin-18 in human monocytic cells. *Cytokine* 2009; 45:99–104.
63. Pietruska M, Zak J, Wysocka J, Jaworowska B, Zelazowska B, Lipska A, Stokowska W. Evaluation of selected peripheral blood leukocyte functions in patients with various forms of periodontal disease. *Arch Immunol Ther Exp* 2004; 52:208-12.
64. Baek KJ, Choi Y, Ji S. Gingival fibroblasts from periodontitis patients exhibit inflammatory characteristics in vitro. *Arch Oral Biol* 2013; 58:1282-92.
65. Navarrete M, García J, Dutzan N, Henríquez L, Puente J, Carvajal P, Hernandez M, Gamonal J. Interferon- $\gamma$ , interleukins-6 and -4, and factor XIII-A as indirect markers of the classical and alternative macrophage activation pathways in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2014; 85:751-60.
66. Scheres N, Laine ML, Sipos PM, Bosch-Tijhof CJ, Crielaard W, De Vries TJ, Everts V. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 2011; 46:407-416.
67. Greetham D, Ellis CD, Mewar D, Fearon U, An Ultaigh SN, Veale DJ, Guesdon F, Wilson AG. Functional characterization of NF-kappaB inhibitor-like protein 1 (NFkappaBIL1), a candidate susceptibility gene for rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 2007; 16:3027-3036.
68. Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta* 2010; 411:1570-1579.

69. Pradeep AR, Daisy H, Hadge P, Garg G, Thorat M. Correlation of gingival crevicular fluid interleukin-18 and monocyte chemoattractant protein-1 levels in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2009; 80:1454-1461.
70. Maeda A, Bandow K, Kusuyama J, Kakimoto K, Ohnishi T, Miyawaki S, Matsuguchi T. Induction of CXCL2 and CCL2 by pressure force requires IL-1 $\beta$ -MyD88 axis in osteoblasts. *Bone* 2015; 74:76-82.

# APÊNDICE 05

## Manuscrito 02



# Transcriptional Profile of Apoptosis-Related Genes in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Induced by *Porphyromonas gingivalis* HmuY

Paulo Cirino de Carvalho-Filho\*, †Márcia Tosta Xavier, and §Soraya Castro Trindade

## ABSTRACT

**Background and Objectives:** *Porphyromonas gingivalis*, an anaerobic gram-negative bacterium considered to be a primary keystone pathogen in dysbiotic processes, is associated with chronic periodontitis. This study was undertaken to assess the transcriptional profile of apoptosis-related genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) under *in vitro* *P. gingivalis* HmuY stimuli from patients with chronic periodontitis.

**Materials and Methods:** PBMCs from patients with chronic periodontitis (CP) and from nonperiodontitis (NP) control subjects were stimulated with HmuY from *P. gingivalis*, and the expression of mRNA for apoptosis-related genes was evaluated by custom real-time polymerase chain reaction using a Custom RT<sup>2</sup> PCR Array.

**Results:** Compared with the NP controls, the CP patients produced relatively low expression levels of apoptosis-related genes, with downregulation of FAS, FAS Ligand, TNFSF10 (TRAIL), BAK1, CASP9 and APAF1 following *P. gingivalis* HmuY stimulation. Furthermore, CP patients produced low levels of relative gene expression, with downregulation of CASP7 when the cells were nonstimulated.

**Conclusion:** Our data suggest that *P. gingivalis* HmuY may have differing effects on the modulation of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways.

## KEY WORDS

*Porphyromonas gingivalis*; periodontitis; apoptosis.

## INTRODUCTION

Periodontitis is a multifactorial disease with significant participation of the host, environmental factors and bacteria. It is known that the host inflammatory response against periodontal pathogens leads to soft and hard tissue destruction [1]. Localized and

\* Department of Immunology, Federal University of Bahia, Bahia, Brazil.

† Odontology Course, Bahiana School of Medicine and Public Health, Bahia, Brazil.

§Department of Periodontics, Feira de Santana State University, Bahia, Brazil.

aggressive forms of periodontitis are associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and chronic forms of widespread disease are associated with other bacteria, including *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola*. Microbial diversity in the oral cavity is immense, and host response during periodontitis is complex, with components of the innate and adaptive immune system that lead to chronic inflammation and bone reabsorption [2].

Recent metagenomic and mechanistic studies are consistent with a new periodontal pathogenesis model that proposes the beginning of periodontal disease due to a synergistic and dysbiotic microbial community, not just a select group of bacteria known as “periodontopathogens”. Bacteria found in low abundance in the microbiota have an effect throughout the community, are critical components in the development of dysbiosis, and are known as “keystones” [3].

*Porphyromonas gingivalis*, a primary keystone pathogen in periodontitis, has a variety of virulence factors, including protein capsules, lipopolysaccharides (LPS), fimbriae, and outer membrane proteins, such as associated and secreted gingipains, which can determine the strength of the immunogenic response by stimulating the immunity mechanism through innate and adaptive immune host responses. Virulence factors, such as specific gingipains for arginine (HRgpA and RgpB) and lysine (Kgp), play an important role in bacterial infection at the onset and during the progression of periodontitis [4].

These bacteria can locally invade periodontal tissues and evade host defense mechanisms using a panel of virulence factors that disrupt the innate immune and inflammatory responses [5]. It was shown that this pathogen has the ability to invade epithelial cells [6], which can be used as an escape mechanism from host defenses, favoring the penetration of the microorganism into the bloodstream and thus acting systemically in the human body [7].

The ability of these bacteria to evade the host immune response and raise nutrients in the microenvironment is directly related to their survival, proliferation and infection. Iron is an essential nutrient for their development. This component is most abundant in the host in the form of hemin [8]. According to Olczak et al. [9], HmuY may be the first reported member of a class of proteins in *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides*

species involved in heme capture and whose function is to capture and deliver it to the cognate membrane receptor HmuR [10, 11].

Recent studies have shown a syntropy among species of the oral biofilm, revealing inter-species cooperation in the acquisition of nutrients. This mechanism reveals how HmuY works together with a protease from other bacterial species to acquire heme in hemoglobin and may represent mutualism between *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* co-inhabiting the periodontal pocket [12]. However, antibodies directed against *P. gingivalis* HmuY are highly specific for the purified protein and cell-bound HmuY, suggesting that this protein can serve as a specific antigen for the determination of serum antibodies directed against this bacterium [13].

HmuY also appears to function in the process of programmed cell death. Human mononuclear blood peripheral cells (PBMCs) cultured with this protein appear to be unable to complete the process of apoptosis, resulting in death characterized by the release of inflammatory cell content into the microenvironment, such as late apoptosis and necrosis, which can prolong the tissue destruction process [14]. Furthermore, the protein induces high levels of Bcl-2 in PBMCs from individuals with chronic periodontitis, resulting in the inhibition of apoptosis by enabling increased survival of CD3<sup>+</sup> T cells, which prolongs the chronic inflammatory condition in periodontitis [15].

The modulation of cell death molecules and mechanisms by microorganisms in periodontal diseases has been demonstrated previously [16, 17, 18, 19, 20, 21]. However, the programmed cell death of mononuclear cells under periodontopathogenic stimuli are not well understood. Furthermore, the role of the polypeptide HmuY in triggering extrinsic and intrinsic apoptosis pathways has not yet been well studied. To test the hypothesis that HmuY can alter human PBMCs, this study aimed to evaluate the transcriptional profile of genes involved in apoptosis mechanisms in PBMCs upon stimulation with the HmuY protein.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Patients and Control Participants***

A total of 8 patients with severe chronic periodontitis (CP) and 8 control subjects without periodontitis (NP) were recruited between 2013 and 2014 from the College of

Dentistry at Feira de Santana State University. The following exclusion criteria were established: presence of diabetes, cardiovascular disease, pregnancy, auto-immune disease, tobacco use, prior periodontal treatment, use of anti-inflammatory drugs within two months prior to inclusion and antibiotic drug use less than six months before inclusion. The present study was approved by the Feira de Santana State University Institutional Review Board (No. 0203.0.059.000-11). All volunteers in this study signed a free informed consent form.

### ***Disease classification***

The periodontal examinations were performed by a single, previously trained examiner (P.C.C.F.) (kappa interexaminer agreement value = 0.932) using a Williams periodontal probe (Hu Friedy, Chicago, IL, USA). The following clinical parameters were evaluated: probing depth (PD), clinical attachment level (CAL) and bleeding on probing (BOP). The examiner was blinded to the status of the participants at the time of the clinical periodontal examination.

Participants were diagnosed as having periodontitis (group CP) if they had at least four teeth with at least one site with a probing depth greater than or equal to 4 mm, clinical attachment loss of 3 mm or more and bleeding upon probing at the same site [22]. Those participants who did not meet these criteria were considered not to have periodontitis (group NP).

Participants were also classified with severe periodontitis if they had at least 2 interproximal sites with clinical attachment loss greater than or equal to 6 mm (not affecting the same tooth) and at least 1 interproximal site with a probing depth of greater than or equal to 5 mm [23].

### ***Antigen***

The *P. gingivalis* HmuY polypeptide lacking the first 25 residues (NCBI accession no. CAM 31898) was overexpressed using the pHmuY11 plasmid and *Escherichia coli* ER2566 cells (New England Biolabs, MA, USA); it was then purified from a soluble fraction of *E. coli* lysate as previously described [24]. Contaminating endotoxins were removed from the HmuY sample using Detoxi-Gel Endotoxin Removing Columns (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). HmuY was prepared at a final concentration of 2.5 µg/mL.

### ***Blood collection and cell culture***

Twenty milliliters of peripheral venous blood were drawn from each individual and collected in heparin tubes. Mononuclear cells (PBMC) were obtained from peripheral blood samples and purified by density centrifugation in accordance with manufacturer guidelines (SepCell, StemCell Technologies Inc., USA). All cells were washed twice in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium (LGCBio, São Paulo, SP, Brazil), and PBMCs were cultured in flat-bottom 24-well plates (10<sup>6</sup> cells/well) in RPMI medium containing 10% fetal calf serum (complement proteins inactivated by heat) and 1% antibiotic/antimycotic solution (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). All cultures were grown for 48 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in humid conditions. Cells were also incubated with 5 µg/mL of pokeweed mitogen (PWM) as a positive control, 2.5 µg/mL of *Porphyromonas gingivalis* rHmuY, or in the absence of antigens (Cells).

### ***Gene Expression***

The total RNA was isolated from 10<sup>6</sup> cells using the miRNeasy Mini kit (QIAGEN, Valencia, California, USA) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 µg of the total RNA using the RT<sup>2</sup> First Strand Kit (SABiosciences, Frederick, MD, USA), which includes the additional removal of genomic DNA from the RNA sample and a specific control of reverse transcription.

The samples were analyzed using the Custom Human RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array CAPH12794 (SABiosciences, Frederick, MD, USA), which was specifically designed for this study. Altogether, 45 different genes were simultaneously amplified in the sample. A melting curve analysis was performed to verify that the product consisted of a single amplicon.

PCR arrays were performed in 384-well plates on an Applied Biosystems<sup>TM</sup> QuantStudio<sup>TM</sup> 12K Flex Real-Time PCR System 384-well block (Applied Biosystems). Briefly, the reaction mix was prepared from 2x SABiosciences RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix and 102 µL of sample cDNA. Ten microliters of this mixture was added to each well of the PCR array. The data were analyzed via Applied Biosystems software, and the Ct values were extracted for each gene. The thresholds and baselines were set according to the manufacturer's instructions (SABiosciences, Qiagen).

### ***Statistical analysis***

The data were analyzed using software supplied by Qiagen (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). The software identified Glucuronidase beta (GUSB) as the most stably expressed housekeeping gene for data normalization. The fold change in gene expression (compared to positive control – PBMC – CP group) was calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method. A more than two fold change in gene expression (compared to positive control – PBMC – CP group) was considered as the up- or downregulation of the expression of a specific gene.

The RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis software does not perform any statistical analysis beyond the calculation of p-values using Student's t-test based on  $2^{(-\Delta C_t)}$  values for each gene in the CP group compared to that in the SP group. The Microarray Quality Control (MAQC) published results indicating that a ranked list of genes based on fold-change and such a p-value calculation was sufficient to demonstrate reproducible results across multiple microarray and PCR arrays, including the RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays [25, 26].

## RESULTS

The periodontitis patients and the healthy subjects were comparable regarding their gender, age and number of teeth present in the mouth as shown in Table 1. As expected, periodontal conditions were worse in the periodontitis patients.

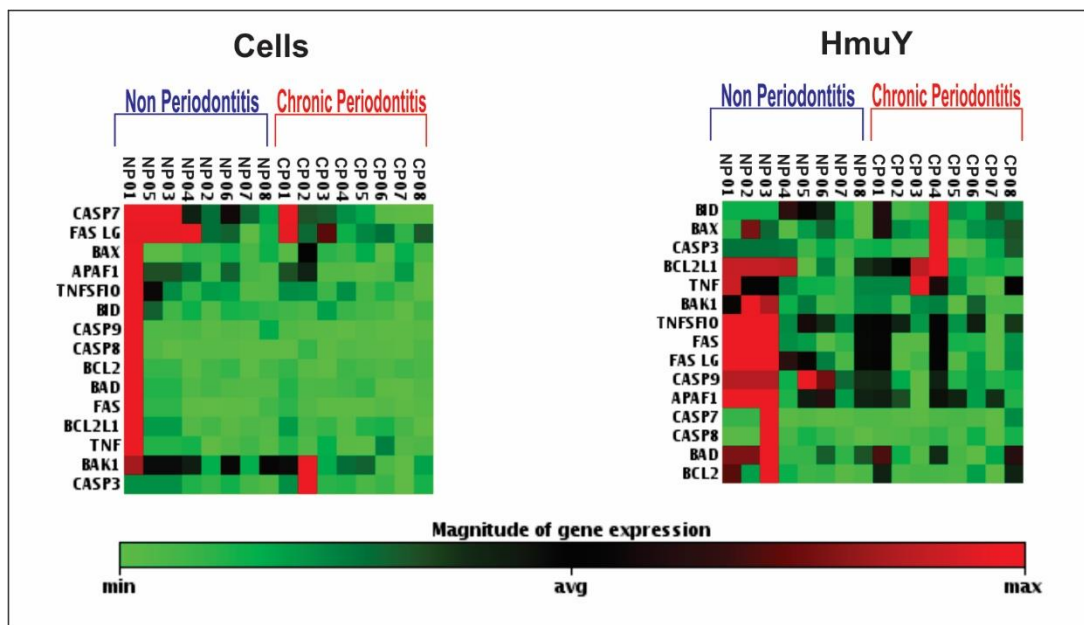
**Table 1:** Clinical findings of control subjects without periodontitis (NP) and patients with chronic periodontitis (CP)

	NP	CP	P
<b>Number of Men/Women</b>	2/6	2/6	1.000
<b>Age (years) (Mean ± SD)</b>	36.63 ±10.8	43.88 ±13.9	0.223
<b>Number of Teeth (Mean ± SD)</b>	20.13 ±6.2	20.31 ±6.5	0.983
<b>% BOP (Mean ± SD)</b>	8.78 ±11.49	46.23 ±14.43	0.001
<b>% PD ≥ 4 (Mean ± SD)</b>	1.01 ±1.55	16.33 ±11.44	0.000
<b>% CAL ≥ 3 (Mean ± SD)</b>	20.40 ±14.03	61.87 ±17.34	0.001
<b>% CAL ≥ 5 (Mean ± SD)</b>	0.45 ±1.27	23.26 ±16.72	0.000

SD, Standard Deviation; BOP, Bleeding on Probing; PD, Probing Depth; and CAL, Clinical Attachment Loss.

### *Expression profile of apoptosis gene targets - Heat Map*

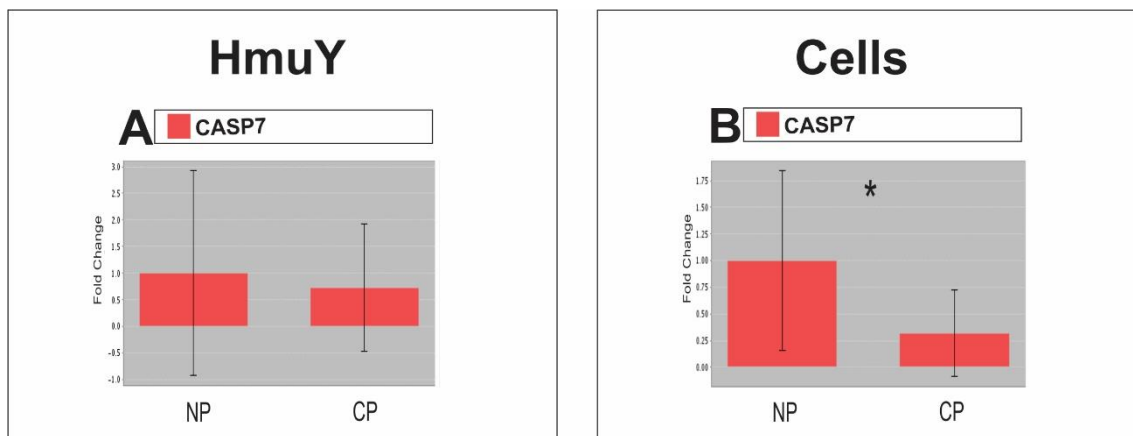
The pattern of mRNA expression analysis indicated differences in gene expression separately attached to the CP and NP groups to cells without stimulation (Cells) and rHmuY (HmuY) stimuli. The variability in the pattern of global gene expression between the PC and SP samples, particularly in the samples of CP and NP groups in PBMCs stimulated with rHmuY, indicated heterogeneity. In both conditions of culturing - stimulation with rHmuY (HmuY) and without antigenic stimulation (Cells) - PBMCs of individuals without periodontitis showed a higher number of upregulated genes because individuals with chronic periodontitis showed a downregulated gene expression profile. Differences were more evident in the NP and CP groups stimulated with rHmuY (HmuY) (Figure 1).



**Figure 1:** Gene cluster identification involved in apoptosis mechanisms by PBMCs from patients with chronic periodontitis (CP) and non-periodontitis subjects (NP) under *Porphyromonas gingivalis* rHmuY (HmuY) stimulus and in the absence of stimuli (Cells). The green-black-red color gradient is the relative levels of gene expression, indicating Under-Even-Over regulation, respectively.

### ***Apoptosis-related gene expression in the intrinsic and extrinsic programmed cell death pathways***

Downregulation and lower levels of fold change for caspase-7 in PBMCs was observed in the CP group subjects compared to the expression levels in cells of individuals in the NP group when the cells were cultured without stimulation (Cells) ( $p = 0.0499$ ) (Figure 2B). There was no statistically significant difference in the fold change of caspase-7 in the cells stimulated with rHmuY between the CP and NP groups ( $p = 0.4055$ ) (Figure 2A).

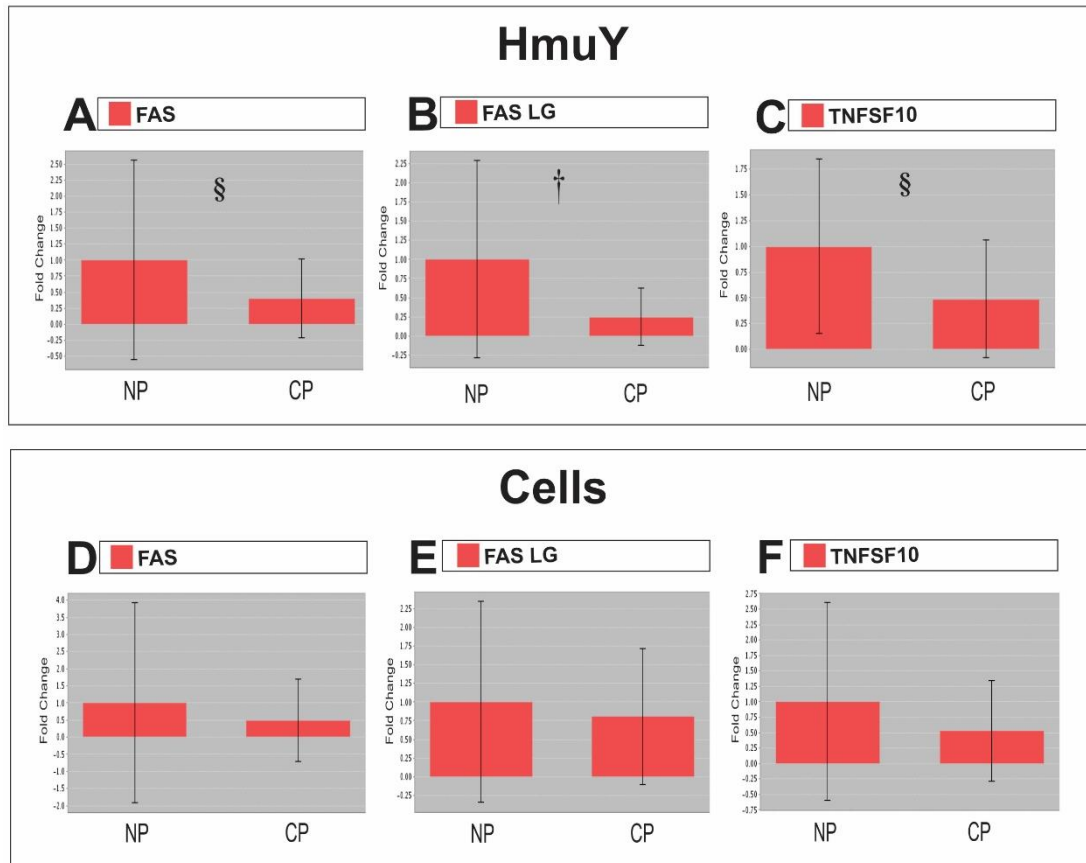


**Figure 2:** Apoptosis-related intrinsic and extrinsic pathway gene expression in PBMCs of the CP and NP groups (A) with *Porphyromonas gingivalis* HmuY stimulation and (B) without stimulation (Cells). A-B. Functional groups of genes involved in programmed cell death that are upregulated with significant ( $p \leq 0.05$ ) or borderline significance ( $0.05 < p < 0.1$ ) in PBMCs of the CP group vs in PBMCs of the NP group. Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase. \* $p=0.0499$ .

### ***Apoptosis-related gene expression in the extrinsic programmed cell death pathway***

Downregulation and lower levels of fold change were observed for FAS, FAS ligand and TNFSF10 (TRAIL) by PBMCs in the CP group subjects compared to expression levels in cells of individuals in the NP group when the cells were cultured under stimulating rHmuY, showing a statistically significant decrease in FAS LG ( $p=0.0120$ ) (Figure 3B) and a borderline statistical significance for FAS and TNFSF10 ( $0.05 < p < 0.1$ ) (Figure 3A and C). No statistically significant difference was observed for FAS, the FAS ligand, or TNFSF10 (TRAIL) expression between the CP and NP groups in cells that were not stimulated (Figure 3D, E and F).



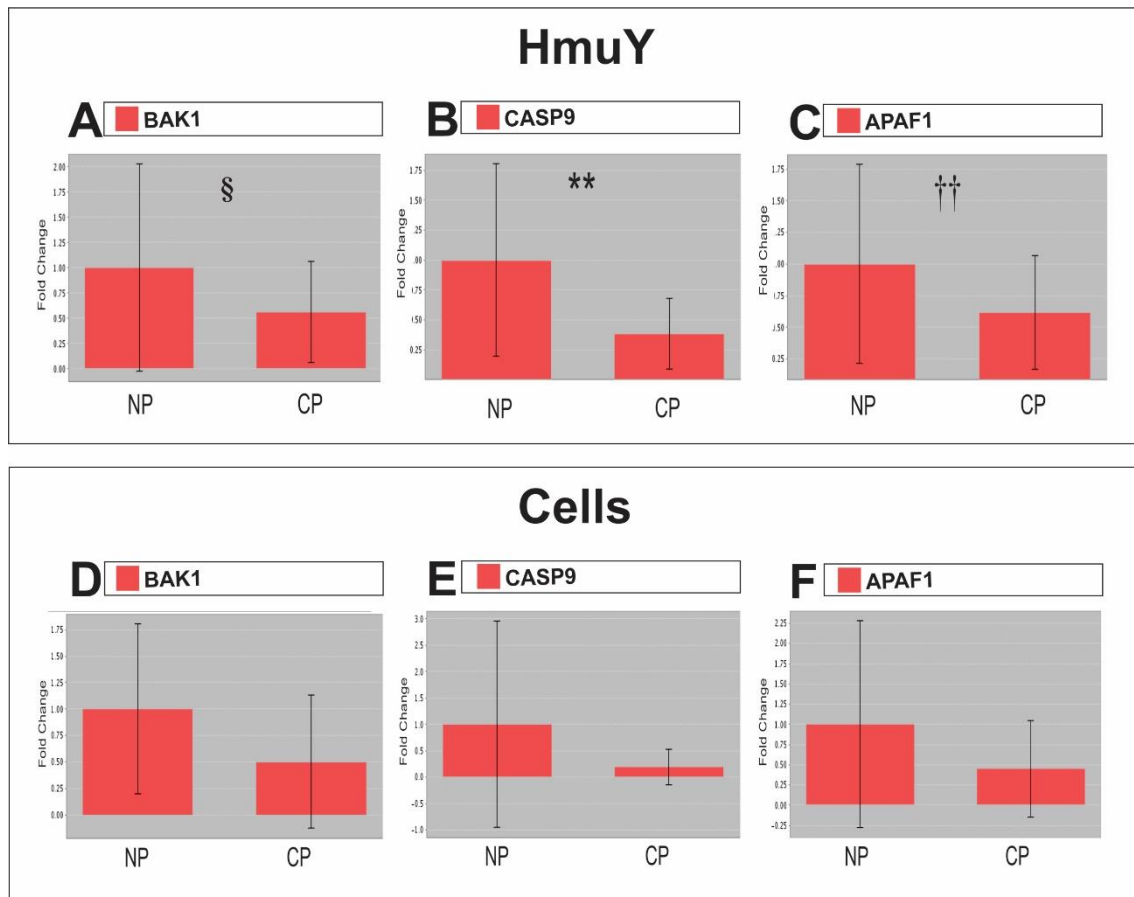


**Figure 3:** Apoptosis-related extrinsic pathway gene expression in PBMCs of CP and NP groups (A-C) with *Porphyromonas gingivalis* HmuY stimulation. A-F. Functional groups of genes involved in programmed cell death that are significantly downregulated ( $p \leq 0.05$ ) or have borderline significance ( $0.05 < p < 0.1$ ) in PBMCs of the CP group vs PBMCs of the NP group. (A and D) Fas (TNF receptor superfamily, member 6). (B and E) Fas ligand (TNF superfamily, member 6). (C and F) Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10. † $p=0.012$ ; § $p<0.1$ .

#### *Apoptosis-related gene expression in the intrinsic programmed cell death pathway*

Downregulation and lower levels of fold change were observed for BAK1, CASP9 and APAF1 by PBMCs in the CP group subjects compared to expression levels in cells of individuals in the NP group when the cells were cultured under rHmuY stimulation, showing a statistically significant difference for CASP9 ( $p=0.0027$ ) and APAF1 ( $p=0.0478$ ) (Figure 4B and C) and a borderline statistical significance for BAK1 ( $0.05 < p < 0.1$ ) (Figure 4A). There was no statistically significant difference in the BAK1,

CASP9 and APAF1 expression levels for cells not stimulated (Cells) between the CP and NP groups (Figure 4D, E and F).



**Figure 4:** Apoptosis-related intrinsic pathway gene expression in PBMCs of CP and NP groups under *Porphyromonas gingivalis* HmuY stimulation. A-C. Functional groups of genes involved in programmed cell death that are significantly upregulated ( $p \leq 0.05$ ) or have borderline significance ( $0.05 < p < 0.1$ ) in PBMCs of the CP group vs PBMCs of the NP group. (A and D) BCL2-antagonist/killer 1. (B and E) Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase. (C and F) Apoptotic peptidase activating factor 1. \*\* $p=0.0027$ ; †† $p=0.0478$ ; § $p<0.1$ .

## DISCUSSION

The most common outcome in inflammatory/infectious conditions is cell death by necrosis. However, a study has demonstrated the induction or inhibition of apoptosis mechanisms in different cells types for challenge by oral microorganisms and their separate molecular components [27, 28, 29, 30, 31, 32]. Previous studies have revealed

the potential of *Porphyromonas gingivalis* HmuY for interfering with cell death mechanisms in human peripheral blood mononuclear cells [14, 15].

In this study, the participation of genes that were differentially expressed in the intrinsic and extrinsic pathways of cell death can be seen in PBMCs of the CP and NP groups. In the extrinsic pathway, apoptosis can be induced by cell surface receptors, such as FAS and TNFR1 [33, 34]. Our data might show statistically significant differences in the fold change of Fas-L and statistically significant differences for the expression of mRNA for FAS and TNFSF10 (TRAIL) in PBMCs from individuals of the CP group when compared with those in the NP group under the *Porphyromonas gingivalis* rHmuY stimulus; these genes were downregulated in the CP group. There were no significant differences in the relative mRNA expression of these genes in PBMCs cultured without stimulation. These findings demonstrate that *Pg* rHmuY may inhibit or lessen the process of apoptosis by downregulating genes that initiate extrinsic pathway signaling in chronic periodontitis. In a recent study of a periodontitis model using a lipopolysaccharide stimulus in mice, the upregulation of mRNA for IL-1 $\beta$  and the FAS ligand was identified [35]. Furthermore, heat-killed *Porphyromonas gingivalis* induced apoptosis in human gingival epithelial cells (CEGH), and the mRNA expression levels for FAS and FAS-L in these cells were upregulated [36].

Another apoptotic receptor implicated in the extrinsic pathway is TRAIL/Apo-2L/TNFSF10. It is a member of the TNF superfamily that, similar to TNF and Fas ligand, induces apoptosis in a caspase-dependent manner followed by TRAIL death-receptor trimerization [37]. Moreover, in a study using PBMCs of healthy donors, TRAIL might have induced osteoclast formation in the absence of RANKL and was detected at high levels in the sera of patients with periodontitis [38], and increased TRAIL-mediated apoptosis in osteoblasts could result in alveolar bone loss in periodontitis [39].

Intrinsic apoptotic stimuli, such as a DNA damage stimulus or stressor to the endoplasmic reticulum, can activate BH3 proteins, which lead to the activation of BAX and BAK, and consequently, mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP). The anti-apoptotic protein Bcl-2 prevents SMME for liaison with BH3 proteins and activates BAX and BAK. After MOMP, various proteins of the mitochondrial intermembrane space (MIS) are released, promoting the activation of caspases and apoptosis. Cytochrome c binds to APAF1, inducing its oligomerization, and thereby forming an apoptosome, which is a known structure that recruits and activates the

apoptosis initiator, caspase 9, which in turn cleaves and activates effectors caspase 3 and caspase 7, leading to apoptosis [40].

Our results indicate differences in mRNA expression referring to targets that participate in molecular signaling apoptosis in the intrinsic pathway in PBMCs of the NP and CP groups with and without rHmuY stimulation. There were statistically significant differences in the mRNA expression of caspase 9 and APAF1 and a significant tendency, borderline statistically significant, for the expression of BAK1 with downregulation of these genes in PBMCs of the CP group upon stimulation with rHmuY. In unstimulated cells, the mRNA expression of caspase-7 was also downregulated significantly in the CP group. Few studies in the literature have demonstrated the participation of the intrinsic apoptotic pathway in periodontitis. Many studies on this pathway in periodontal disease include anti-apoptotic molecules such as Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-6 [15, 27, 41, 42, 43].

Yoshimoto et al. (2015) [44] demonstrated a pro-apoptotic profile in an experiment with human epithelial cell lines (OBA9) stimulated with recombinant TGF- $\beta$ 1, including a high activity of caspase-3 and a high number of TUNEL-positive apoptotic cells. Furthermore, the levels of pro-apoptotic proteins BAX, BAK, BIM, and BAD were increased in OBA9 cells stimulated with TGF- $\beta$ 1, and the treatment of TGF- $\beta$ 1 decreased the levels of anti-apoptotic proteins, such as BCL-2 and BCL-XL, in a time-dependent manner. Elevated protein levels of TGF- $\beta$ 1 upregulated cleaved caspase-9. These results indicate that apoptosis induced by TGF- $\beta$ 1 involves the intrinsic mitochondrial pathway. However, the manipulation of mitochondrial function by *Porphyromonas gingivalis* and its A44 adhesion peptide in epithelial cells during the first few hours of infection could hinder the host clearance of infected cells in the process of apoptosis, suggesting that this mechanism may allow bacteria to be protected and persist in the cellular environment until the next step of pathogenesis, progression or resolution of the infection [45].

## CONCLUSIONS

The negative modulation by inhibition of the apoptotic process can enable *Porphyromonas gingivalis* to infect cells and provide a mechanism to escape the host immune system. These findings suggest that this keystone pathogen can reduce or inhibit PBMC apoptosis through downregulation of the mRNA of genes involved in the intrinsic

and extrinsic pathways of early pro-apoptotic signaling in programmed cell death under HmuY lipoprotein stimuli in patients with chronic periodontitis. This process could lead to continuous production of pro-inflammatory cytokines and chemokines in the microenvironment of the inflamed periodontal tissue, improving survival and chemotaxis of cells involved in immune defense mechanisms, and thereby resulting in a chronic inflammatory state, the destruction of periodontal tissues and possibly in the establishment of dysbiotic processes in individuals affected by this disease. However, it is worth noting that the number of volunteers for the study was relatively small, requiring further studies with larger numbers of individuals to establish the role of *Porphyromonas gingivalis* HmuY and participation of this pathogen in inflammation and molecular mechanisms of cell death and to provide new insights into the immunopathogenesis of chronic periodontitis.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Grant APP019/2011 from the Research Support Foundation of the State of Bahia (Soraya Trindade) and by a student fellowship from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel in Brazil (awarded to Paulo Cirino de Carvalho Filho). The authors would like to thank the Laboratory of Immunology and Molecular Biology and Laboratory Allergy and Acarology at the Health Sciences Institute of the Federal University of Bahia (UFBA).

## REFERENCES

1. Deo V, Bhongade ML. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response. *Dent Today* 2010; 29:60-62.
2. Huang N, Gibson, FC. Immuno-pathogenesis of Periodontal Disease: Current and Emerging Paradigms. *Current oral health reports* 2014; 1:124-132.
3. Hajishengallis G, Lamont RJ. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur. J. Immunol* 2014; 44:328–338.
4. Zenobia C, Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence* 2015; 6:236-243.

5. Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett* 2012; 333:1-9.
6. Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CA. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect Immun* 1997; 65:1980-1984.
7. Walter C, Zahlten J, Schmeck B, Schaudinn C, Hippenstiel S, Frisch E, Hocke AC, Pischon N, Kuramitsu HK, Bernimoulin JP, Suttorp N, Krüll M. *Porphyromonas gingivalis* strain-dependent activation of human endothelial cells. *Infect Immun* 2004; 72:5910-5918.
8. Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco CA: Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29:119–144.
9. Olczak T, Sroka A, Potempa J, Olczak M: *Porphyromonas gingivalis* HmuY and HmuR – further characterization of a novel mechanism of heme utilization. *Arch Microbiol* 2008; 183:197–210.
10. Olczak T, Siudeja K, Olczak M. Purification and initial characterization of a novel *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein expressed in *Escherichia coli* and insect cells. *Protein Expr Purif* 2006;49:299-306.
11. Wojtowicz H, Guevara T, Tallant C, et al. Unique structure and stability of HmuY, a novel heme-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS Pathog* 2009;5: e1000419.
12. Byrne DP, Potempa J, Olczak T, Smalley JW. Evidence of mutualism between two periodontal pathogens: co-operative haem acquisition by the HmuY haemophore of *Porphyromonas gingivalis* and the cysteine protease interpain A (InpA) of *Prevotella intermedia*. *Mol Oral Microbiol* 2013; 28:219-29.
13. Śmiga M, Bielecki M, Olczak M, Smalley JW, Olczak T. Anti-HmuY antibodies specifically recognize *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein but not homologous proteins in other periodontopathogens. *PLoS One* 2015; 10:e0117508.
14. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, et al: *Porphyromonas gingivalis* antigens differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. *Arch Oral Biol* 2012; 57:314–320.

15. 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<sup>+</sup> T cells. *BMC Microbiol* 2013; 13:206.
16. Mori K, Yanagita M, Hasegawa S, Kubota M, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Necrosis-induced TLR3 Activation Promotes TLR2 Expression in Gingival Cells. *J Dent Res* 2015; 94:1149-1157.
17. Pradeep AR, Suke DK, Prasad MV, Singh SP, Martande SS, Nagpal K, Naik SB, Guruprasad CN, Raju AP, Singh P, Siddaya M. Expression of key executioner of apoptosis caspase-3 in periodontal health and disease. *J Investig Clin Dent* 2014; doi: 10.1111/jicd.12134.
18. Zheng Y, Hou J, Peng L, Zhang X, Jia L, Wang X, Wei S, Meng H. The pro-apoptotic and pro-inflammatory effects of calprotectin on human periodontal ligament cells. *PLoS One* 2014; 9:e110421.
19. Ao M, Miyauchi M, Inubushi T, Kitagawa M, Furusho H, Ando T, Ayuningtyas NF, Nagasaki A, Ishihara K, Tahara H, Kozai K, Takata T. Infection with *Porphyromonas gingivalis* exacerbates endothelial injury in obese mice. *PLoS One* 2014; 9:e110519.
20. Li Q, Pan C, Teng D, Lin L, Kou Y, Haase EM, Scannapieco FA, Pan Y. *Porphyromonas gingivalis* modulates *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis of respiratory epithelial cells through the STAT3 signaling pathway. *Microbes Infect* 2014; 16:17-27.
21. Tsuda H, Ning Z, Yamaguchi Y, Suzuki N. Programmed cell death and its possible relationship with periodontal disease. *J Oral Sci* 2012; 54:137-149.
22. Gomes-Filho IS, Cruz SS, Rezende EC, et al: Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol* 2007; 34:957–963.
23. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol* 2007; 78:1387-1399.

24. Olczak T, Wojtowicz H, Ciuraszkiewicz J, Olczak MR: Species specificity, surface exposure, protein expression, immunogenicity, and participation in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* HmuY. *BMC Microbiol* 2010; 10:134.
25. Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1151–1161.
26. Shi L, Campbell G, Jones WD, Campagne F, Wen Z, Walker SJ, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC)-II study of common practices for the development and validation of microarray-based predictive models. *Nat Biotechnol* 2010; 28:827–838.
27. Wang Q, Sztukowska M, Ojo A, Scott DA, Wang H, Lamont RJ. FOXO responses to *Porphyromonas gingivalis* in epithelial cells. *Cell Microbiol* 2015; 12459.
28. 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* 2015; 86:1095-1102.
29. 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* 2014; 93:1148-1154.
30. Zhao P, Liu J, Pan C, Pan Y. NLRP3 inflammasome is required for apoptosis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-infected human osteoblastic MG63 cells. *Acta Histochem* 2014; 116:1119-1124.
31. Li Q, Pan C, Teng D, Lin L, Kou Y, Haase EM, Scannapieco FA, Pan Y. *Porphyromonas gingivalis* modulates *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis of respiratory epithelial cells through the STAT3 signaling pathway. *Microbes Infect* 2014; 16:17-27.
32. Bostanci N, Thurnheer T, Aduse-opoku J, Curtis MA, Zinkernagel AS, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis* regulates TREM-1 in human polymorphonuclear neutrophils via its gingipains. *PLoS One* 2013; 8:e75784.
33. GIOGHA, C.; LUNG, T.W.; PEARSON, J.S.; HARTLAND, E.L. Inhibition of death receptor signaling by bacterial gut pathogens. *Cytokine Growth Factor Rev.* v.25, p.235-243, 2014.



34. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:47-59.
35. Firth JD, Ekuni D, Irie K, Tomofuji T, Morita M, Putnins EE. Lipopolysaccharide induces a stromal-epithelial signalling axis in a rat model of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2013; 40:8-17.
36. Brozovic S, Sahoo R, Barve S, Shiba H, Uriarte S, Blumberg RS, Kinane DF. *Porphyromonas gingivalis* enhances FasL expression via up-regulation of NFkappaB-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cells. *Microbiology* 2006; 152:797-806.
37. Amarante-mendes GP, Griffith TS. Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond. *Pharmacol Ther* 2015; 15:166-167.
38. Brunetti G, Oranger A, Mori G, Sardone F, Pignataro P, Coricciati M, Napoli N, Rizzi R, Liso V, Grassi FR, Grano M, Colucci S. TRAIL effect on osteoclast formation in physiological and pathological conditions. *Front Biosci* 2011; 3:1154-1161.
39. 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. Alteration of activity and survival of osteoblasts obtained from human periodontitis patients: role of TRAIL. *J Biol Regul Homeost Agents* 2007; 21:105-114.
40. Stephen WG, Green TDR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010; 11:621-632.
41. Lakschevitz FS, Aboodi GM, Glogauer M. Oral neutrophil transcriptome changes result in a pro-survival phenotype in periodontal diseases. *PLoS One* 2013; 8:e68983.
42. 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.
43. Tonetti MS, Cortellini D, Lang NP. In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. *Infection and Immunity* 1998; 66:5190-5195.

44. Yoshimoto T, Fujita T, Kajiya M, Matsuda S, Ouhara K, Shiba H, Kurihara H. Involvement of smad2 and Erk/Akt cascade in TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis in human gingival epithelial cells. *Cytokine* 2015; 75:165-173.
45. Boisvert H, Duncan M. Translocation of *Porphyromonas gingivalis* gingipain adhesin peptide A44 to host mitochondria prevents apoptosis. *Infect Immun* 2010; 78:3616-3624.

# APÊNDICE 06

## Manuscrito 03

# ***Porphyromonas gingivalis* HmuY: It's Role in Immunopathogenesis of Chronic Periodontitis**

Carvalho-Filho PC<sup>1</sup>, Xavier MT<sup>1</sup>, Trindade SC<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Odontology Course, Bahiana School of Medicine and Public Health, Bahia, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Periodontics, Feira de Santana State University, Bahia, Brazil.

## **Abstract**

Periodontitis is a multifactorial disease, with significant participation of the host, environmental factors and bacterial. Its early stage results from synergistic and dysbiotic multispecies microorganisms where known as “keystone” have effects throughout the community and are critical components in the development of dysbiotic process. This category is *Porphyromonas gingivalis*, an anaerobic gram-negative bacilli associated chronic generalized forms of the disease. The host response during periodontitis is complex with components of the innate and adaptive immune system that lead to chronic inflammation and progressive destruction of periodontal tissue support. In this pro-inflammatory process, the ability of *Porphyromonas gingivalis* to evade the host immune response and access nutrients in the microenvironment is directly related to their survival, proliferation and infection. Furthermore, the iron is one of essential nutrients for the development of these bacteria and HmuY and is a lipoprotein responsible for the capture of hemin. The inflammatory potential of *Porphyromonas gingivalis* HmuY has been shown, induced high levels of pro-inflammatory Cytokines and CCL2. Thus HmuY inhibit IL-8. Furthermore, HmuY increased anti-HmuY IgG and IgG1 levels in patients with chronic periodontitis. The HmuY protein used by bacteria to iron uptake, to be highly specific, makes it a promising target for therapeutic strategies and for diagnostic in refractory periodontitis, and monitoring of maintenance therapy in subjects with chronic periodontitis. However, more studies are needed to demonstrate the immunomodulatory role of HmuY in chronic periodontitis.

**Keywords:** HmuY; Periodontal disease; Periodontitis; Immunopathogenesis; *Porphyromonas gingivalis*

## Introduction

Periodontal disease is the most common chronic inflammatory disease in humans [1]. It comprises a number of inflammatory and infectious conditions caused by the interaction between the supragingival and subgingival biofilms and inflammatory host response. Periodontal disease is modulated by body systems and can play an important role as a risk factor for systemic disorders. Current evidence in the scientific literature supports some of these interactions, such as smoking as a risk factor for periodontal disease and diabetes mellitus, and how both are influenced and influence inflammatory changes in periodontal tissue. Other potential associations are still being investigated, such as obesity, hormonal changes, cardiovascular disease, and adverse outcomes in pregnancy [2, 3].

Periodontal disease can be described as a series of pathological alterations that occur in periodontal tissue resulting from an inflammatory response to injury of periodontal pathogens present in the biofilm, may affect only the gums, gingivitis or progress for supporting periodontium in periodontitis, leading mobility and subsequent loss of teeth units affected by the disease process [4]. Clinically it is observed in periodontitis: alveolar bone resorption, clinical attachment loss, the presence of periodontal pocket and gingival inflammation [5].

Periodontitis is a multifactorial disease, with significant participation of the host, environmental factors and bacterial. However, it is a host inflammatory response that leads to most of the soft and hard tissue destruction. Localized and aggressive forms of periodontitis are associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, while chronic forms of widespread disease with different bacteria, including *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, among others. Microbial diversity of the oral cavity is immense, and the host response during periodontitis complex with components of the innate and adaptive immune system that lead to chronic inflammation and bone loss [6].

Recent metagenomic studies and mechanistic are consistent with a new periodontal pathogenesis model that proposes the beginning of periodontal disease for a synergistic and disbiótica microbial community, not just a select group of bacteria known as "periodontal". Bacteria found in low abundance in the microbiota have effect throughout the community and are critical components

for the development of dysbiosis, are known as "keystone" pathogens [7]. The best-documented example is *Porphyromonas gingivalis*, a gram-negative bacilli, anaerobic, and strict assacarolítico Bacteroidaceae family that has been implicated in human periodontitis [8].

### **The Immunopathogenesis of Chronic Periodontitis**

Bacterial infection is the primary etiologic factor, but it is not sufficient to induce the disease onset or progression. Derived from bacteria factors stimulate a local inflammatory reaction and activation of the innate immune system. The innate response involves components of microbial recognition by host cells, and this event can be mediated by Toll-like receptors (TLRs) expressed by the resident cells and leukocytes. Activation of these cells leads to the release of pro-inflammatory cytokines and recruit phagocytes and lymphocytes. The activation of T lymphocytes initiates the adaptive immune response Th1, Th2, Treg and Th17 as B lymphocytes participate in this process with the production of antibodies [9].

Currently, many functionally distinct subsets of CD4<sup>+</sup> T cells and activated CD8<sup>+</sup> cells have been described, each with different cytokines and transcription factors expressed. NF-kappaB (NFκB) is a key transcription factor complex that appears to play a key role in the regulation of acute inflammation through the activation cascade of cytokines and production of other proinflammatory mediators, including adhesion molecules such as ICAM-1 and VCAM-1, E-selectin, enzymes such as COX-2, 5-LO, CPLA and iNOS and various cytokines such as IL-1, TNF, IL-6, GM and G-CSF, and chemokines such as IL-8, RANTES, MCP-1, Eotaxin and MIP-1κ [10, 11, 12]. The Study of [13] suggested that inhibition of the activation of NFκB by NFKBIL1 gene. According to [14], the inhibitory protein "κB-like" (IκBL) encoded by HLA-NFKBIL1 bond, is a protein of unknown function, while genetic variations in NFKBIL1 are associated with susceptibility to diseases inflammatory and / or autoimmune diseases.

For CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, are included Th1 lymphocytes which express the transcription factor T-bet and IL-2 cytokines, IFN-γ and TNF-β; The Th2 lymphocytes expressing GATA-3 and IL-4, IL-5 and IL-13; and Th17 and RORγt lymphocytes expressing the cytokines IL-17A, IL-17F, IL-21 and IL-22. The produced cytokines determine that mediate the inflammatory process. Modern

profiles of cytokines and analyses of transcription factors have led to more detailed classification of T helper cells; the profiles Th17, Th1, Th9, and Th22 cells are altered in periodontal diseases [15, 16, 17, 18, 19, 20]. Effector T cells may become naive, recently activated, or memory T cells that can be distinguished by cell surface markers [21].

Recent studies have shown the involvement of Interleukin-33 (IL-33) in the pathogenesis of periodontitis [22, 23, 24]. This cytokine is described as IL-1 family member expressed by many cell types following proinflammatory stimulation and participate in cell lysis mechanisms. Increased levels of IL-33 secreted in periodontal tissues can exacerbate periodontal destruction induced by RANKL [22, 25], but this relationship is not yet fully established, since other studies They found a positive association between IL-33 levels in the periodontal tissues and periodontitis [26, 27]. In addition, [24] hypothesized that this cytokine can have a protective role by inducing a predominant Th2 profile.

Recently, several studies have also shown a close relationship between increased levels of interleukin-18 (IL-18) and the pathogenesis of chronic periodontitis [28, 29, 30, 31, 32, 33]. IL-18 is a potent proinflammatory cytokine with structural similarity to IL-1beta [34]. In the presence of IL-12, IL-18 induces Th1 responses, whereas in the absence of IL-12, Th2 responses are promoted. Therefore, IL-18 has the ability to induce differentiation into Th1 or Th2 cells [35].

T cells also secrete pro-resorptive cytokines, such as IL-1, IL-6 and IL-17, and each of these cytokines stimulates the expression of receptor activator of NF $\kappa$ B ligand (RANKL) in osteoblasts and fibroblasts, which promotes osteoclast formation in a contact-dependent process. CD4<sup>+</sup> IL-17-producing cells are designated as a subpopulation of Th17 cells and express TNF, IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). These cells are responsive to IL-23, which controls cell expansion and survival [36].

The microenvironment of the periodontal lesion may also include IL-10, which affects various cell types, including T cells, B cells, macrophages, NK cells, mast cells and neutrophils. The negative effects of IL-10 include modulation of IL-1, IL-8, IL-12 and TNF- $\alpha$  and inhibition of phagocytosis [37].

T regulatory cells (Treg) [38, 39] and Th17 cells [40, 41] have been identified in periodontal tissues, suggesting the importance of immunoregulation in periodontal disease. The clinical implications of these studies can be seen in the identification of Th1/Th2 and Treg/Th17 genes in peripheral blood and salivary transcriptomes that are now being tested as possible susceptibility markers for disease [42].

Typically, the T cell repertoire contains T regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> lymphocytes that control the autoreactive immune responses in the periphery [43]. The population of regulatory T cells CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T and possibly other cells are found in periodontal disease and shown to be higher in periodontitis compared to gingivitis [44]. The T regulatory cells are responsible for the mechanisms of tolerance and cell suppressive function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> was found to be partly dependent on cell contact, suggesting that the human mucosa induces tolerance to different antigens [45].

### **Antigenic Determinants of *Porphyromonas gingivalis***

*Porphyromonas gingivalis*, is a Gram-negative bacilli (G) anaerobic strict, the Bacteroidacea family of great importance as etiologic agent of periodontal disease, especially in co-infection with other bacteria. This bacterium has a variety of virulence factors such as proteins capsule, lipopolysaccharide (LPS), fimbriae, and outer membrane proteins, such as those associated and secreted gingipainas, can determine a great immunogenicity by stimulating mechanism of innate and adaptive immunity, both in the humoral immune response as the cellular immune response of the host. Virulence factors such as specific Gingipainas for arginine (HRgpA and RgpB) and lysine (Kgp), Lipids A1 and 40, serine phosphatase (SerB), peptidyl arginine deaminase, nucleoside diphosphate kinase, fimbriae (FIMA and MFA1), have Hemagglutinin an important role in bacterial infection in the initiation and progression periodontitis [46].



Gingipain-like cysteine proteases are trypsin produced by *Porphyromonas gingivalis*. The virulence activity gingipain has several mechanisms of activation and inactivation of host proteins by stimulating the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in fibroblasts [47, 48, 49]. MMPs are a group of zinc-dependent enzymes responsible for the degradation of extracellular matrix during tissue renewal and also during the inflammatory processes. The expression and activity of MMPs in tissue in the adult is normally low, but significant increases in several pathological conditions which can lead to tissue destruction, such as inflammatory disorders, tumor growth and metastasis. These enzymes can specifically cleave and degrade collagen and connective tissue matrix in physiological pH and temperature. When secreted can destroy periodontal tissues, degrading cytokines, the complement system components and various receptors, including CD14 in macrophages, CD4 and CD8 T cells, Bypassing the host defense systems, thereby facilitating colonization by *P. gingivalis* [50, 51].

*Porphyromonas gingivalis* can locally invade the periodontal tissues and evade the host defense mechanisms, using a panel of virulence factors that disrupt the innate immune and inflammatory responses [52]. It was shown that this pathogen has the ability to invade epithelial cells [53], which can be an escape mechanism from host defenses, favoring the penetration of the microorganism in the bloodstream and thus acting systemically in their body [54].

The LPS of *Porphyromonas gingivalis* is structurally different from the LPS of other Gram-negative bacteria, but also have different immunogenic properties. It is recognized by the innate host cells by Toll-like receptor (TLR)-2 [55, 56] can interact with TLR-2 and TLR-6 [57]. This unusual pattern recognition depends on the structural heterogeneity of lipid A [58] that enable connection to both the TLR-2 and TLR-4 in association with CD14. Furthermore, a lipoprotein associated to LPS of *Porphyromonas gingivalis* (PG1828) identified by [59], appears to be extremely involved in signaling by TLR-2 and this removal can markedly reduce the LPS of *Porphyromonas gingivalis* recognition by this route.

### **The rule of *Porphyromonas gingivalis* HmuY**

The *Porphyromonas gingivalis* capacity to evade the host immune response and raise nutrients in the microenvironment is directly related to their survival, proliferation and infection and iron is

one of nutrients essential for their development. This component is in greater abundance in the host in the form of hemin [60], which is a co-factor for the stock of oxygen, electron transport and redox biochemistry, essential for the survival of the bacteria [61]. Thus, *Porphyromonas gingivalis* has special mechanisms that enable to remove proteins hemin and hemoglobin bound to haptoglobin and hemin complexed with hemopexin [62] using serum transferrin and lactoferrin located on the mucosal surfaces for their growth [63, 64].

In the acquisition of iron, hemin, *Porphyromonas gingivalis* makes use of hemagglutinin, proteases (particularly gingipain), specific lipoproteins and receptors of the outer membrane [65, 66, 60]. Studies have shown that gingipainas specific for lysine and arginine (Kgp and RGP, respectively) can bind and subsequently cleaving hemoglobina [67], promoting the degradation of the vascular endothelial thrombomodulin [68].

The characterization of a structural gene for a new outer membrane TonB-dependent receptor (HmuR), needed to capture and use of hemoglobin and hemin by *P. gingivalis* was reported by [69]. Inactivation resulted in decreasing bacteria's ability to bind hemoglobin and grow in an environment with hemoglobin or hemin as a sole source of iron [69, 70, 71, 72]. The hmuR gene is located in an operon with a hmuY gene in *Porphyromonas gingivalis* strains A7436 [69] and W83 [71].

HmuY peptide is a 24 kDa ligand hemin membrane associated. It may be functional in the form of dimers or oligomers and their amino-terminal structure [73] is identical to Activator Factor fibroblasts (FAF), previously identified in *Porphyromonas gingivalis* strains W50, W83 and ATCC33277 [74], which exerts a low phosphatase activity and could be involved in bone resorption, in addition to inducing proliferation of fibroblasts and is functionally similar to other human growth factors. According to [69], HmuY may be the first reported member of a class of proteins in *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides* species involved in using Hemin, whose function is to kidnap her and give it to your carrier cognate membrane, HmuR [72, 61].

Any HmuY as HmuR appear to be essential for the survival and growth of *Porphyromonas gingivalis*, since A7436 strain of mutant called T01 (with deletion at hmuY gene and insertion of

tetQ gene, which confers resistance to tetracycline), T02 (with deletion of the genes hmuY and hmuR and insertion of tetQ and ERMF genes that erythromycin resistance confers), T03 and T04 (with in-frame deletion of an internal region of hmuY gene 300pb and inserting the ERMF gene in sense positions and anti-sense) respectively showed defects in growth when hemin and hemoglobin have been used as the sole iron source [73].

The HmuY protein is highly abundant in the outer surface of the cell in outer membrane vesicles and released in soluble form in culture. HmuY is constitutively present at low levels in bacterial cultures grown under conditions of high hemin / iron; Under conditions of low hemin / iron biofilm characteristics, the protein is produced at high levels. It plays a significant role not only in the acquisition of hemin, but also in the formation of biofilm. It has been suggested that cell surface protein can be recognized by the host immune system during chronic periodontitis and the production of anti-HmuY antibodies could inhibit biofilm formation [75].

Recent studies have shown syntropy between different bacterial species of the oral biofilm through mutual cooperation for the acquisition of nutrients. This mechanism reveals how HmuY works with a cysteine protease, interpain A (InpA) of *Prevotella intermedia*, to acquire heme in hemoglobin and may represent mutualism between *P. gingivalis* and *P. intermedia* co-inhabiting the periodontal pocket. HmuY and gingipain protease *Porphyromonas gingivalis* form a single syntropic system responsible for heme capture of hemoglobin and methaemalbumin. HmuY is resistant to proteolysis and thus able to cooperate with *P. intermedia* InpA to extract the heme from hemoglobin, previously converted proteolytically into methemoglobin. [76].

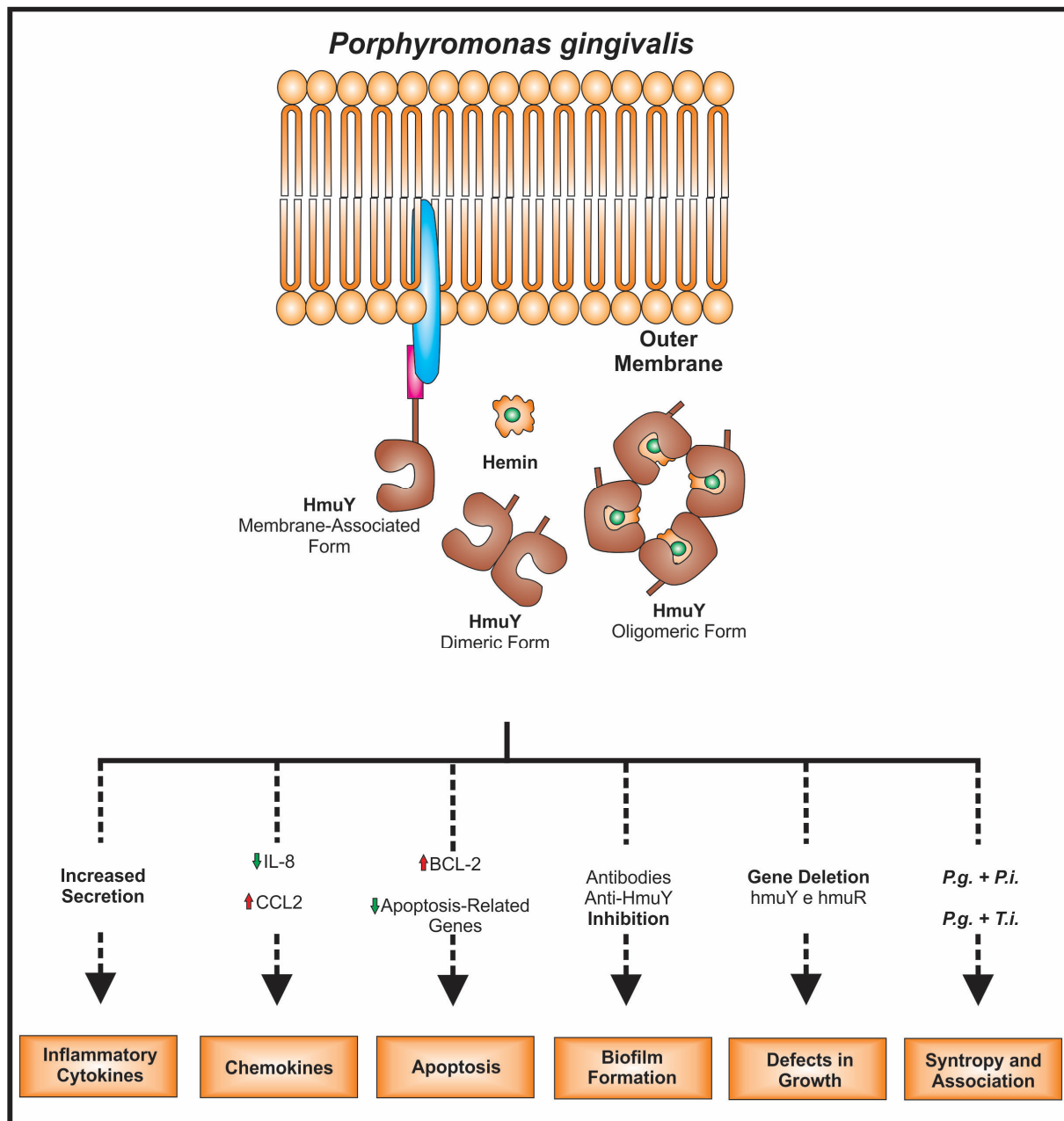
In addition, there is a close association between *P. gingivalis* and *T. denticola*, since these bacteria in polymicrobial culture *Tannerella forsythia*, seem to join and dominate the biofilm [77]. This interaction causes a shift strategy in the acquisition of iron by *P. gingivalis*, favoring an increase of HusA ("heme uptake system protein A") and HusB ("heme uptake system protein B") that are heme-binding proteins, while HmuY and other iron transport systems / heme decrease.

The study of [78] demonstrated in rabbits immunized with HmuY and homologs thereof from *Prevotella intermedia* and *Tannerella forsythia*, the antibodies directed against *P. gingivalis* HmuY

are highly specific for the purified protein and cell bound *P. gingivalis* HmuY. No reactivity was detected between P and T. *Forsythia intermedia* or between the homologous purified from these bacteria and anti-HmuY antibodies, suggesting that the protein HmuY *P. gingivalis* can serve as a specific antigen for the determination of serum antibodies against this bacterium.

The immunogenic potential of *Porphyromonas gingivalis* HmuY, has been shown, observing their ability to promote inflammation, inducing high IL-1 $\beta$  and IL-6 [79, 80] Furthermore, HmuY seems to participate in a delayed response to the increase in IL-10 levels, IgG and IgG1 anti HmuY and inhibition of IL-8 production in patients with chronic periodontitis [79] (Trinity et al, 2012) and high IL-6 production [80]. Furthermore, *P. gingivalis* HmuY evokes inflammatory responses in peripheral blood mononuclear cells of chronic periodontitis patients, eliciting CCL2 and IL-18, as well as inhibiting NFKBIL-1 and IL-10 [81].

The HmuY protein of *Porphyromonas gingivalis* also seems to act in the programmed cell death process. PBMC contact with the protein in culture appear to be unable to complete the process of apoptosis, resulting in death characterized by release of inflammatory cell content in the microenvironment, such as late apoptosis and necrosis, which can prolong the tissue destruction process [82]. Furthermore, the protein induces high levels of Bcl-2 in mononuclear cells from peripheral blood (PBMC) from individuals with chronic periodontitis, resulting in inhibition of apoptosis by enabling increased survival of T CD3<sup>+</sup> Cells [83], and *Porphyromonas gingivalis* can reduce or inhibit PBMC apoptosis through downregulation of the mRNA of genes involved in the intrinsic and extrinsic pathways of early pro-apoptotic signaling in programmed cell death under HmuY lipoprotein stimuli in patients with chronic periodontitis [81]. Thus, *Porphyromonas gingivalis* HmuY plays an important role in the immunopathogenesis of periodontitis to evoke inflammatory response, inhibiting apoptosis and interacting with other bacterial species for biofilm formation (Figure 01).



**Figure 01:** The role of HmuY.

## Conclusion

*Porphyromonas gingivalis*, the main agent of periodontitis, is an important component of the oral microbiome and a highly adapted colonizer. *P. gingivalis* has the ability to evade the host defense systems and interfere in relations between other species that make up the microflora located in the periodontal biofilm leading a chronic inflammatory process, a cell pro-survival profile and

consequent tissue damage observed in subjects with chronic periodontitis. Molecules isolated and purified from *P. gingivalis*, have an important role in the immunopathogenesis of chronic periodontitis, acting both in innate and adaptive immunity. The HmuY protein used by bacteria to iron uptake, to be highly specific, makes it a promising target for therapeutic strategies and for diagnostic in refractory periodontitis, and monitoring of maintenance therapy in subjects with chronic periodontitis. However, more studies are needed to demonstrate the immunomodulatory role of HmuY in chronic periodontitis.

## Acknowledgement

This study was supported by grant no. APP019/2011 from the Research Support Foundation of the State of Bahia (Soraya Trindade) and by a student fellowship from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel in Brazil (awarded to Paulo Cirino de Carvalho Filho). The authors would like to thank the Laboratory of Immunology and Molecular Biology and Laboratory Allergy and Acarology at the Health Sciences Institute of the Federal University of Bahia (UFBA).

## References

1. Benakanakere M, Kinane DF. Innate cellular responses to the periodontal biofilm. *Front Oral Biol.* 2012; 15:41–55.
2. Oppermann RV, Weidlich P, Musskopf ML. Periodontal disease and systemic complications. *Braz. oral res.* 2012; 26:39-47.
3. Nagpal R, Yamashiro Y, Izumi Y. The Two-Way Association of Periodontal Infection with Systemic Disorders: An Overview. *Mediators Inflamm.* 2015; 793898.
4. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2004;35:21-41.
5. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2004; 34:9-21.
6. Huang N, Gibson FC. Immuno-pathogenesis of Periodontal Disease: Current and Emerging Paradigms. *Current oral health reports.* 2014; 1:124-132.
7. Hajishengallis G, Lamont RJ. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur. J. Immunol.* 2014; 44:328–338.
8. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini M, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25:134-44.

9. Benedetto AB, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal Disease: Linking the Primary Inflammation to Bone Loss. *Clin Dev Immunol.* 2013; 503754.
10. Fujita Y, Nakayama M, Naito M, Yamachika E, Inoue T, Nakayama K, Iida S, Ohara N. Hemoglobin receptor protein from *Porphyromonas gingivalis* induces interleukin-8 production in human gingival epithelial cells through stimulation of the mitogen-activated protein kinase and NF- $\kappa$ B signal transduction pathways. *Infect Immun.* 2014; 82:202-211.
11. Christma NJW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Intensive Care Med.* 1998; 24:1131-1138.
12. Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 1993; 14:436-441.
13. Atzei P, Gargan S, Curran N, Moynagh PN. Cactin targets the MHC class III protein IkappaB-like (IkappaBL) and inhibits NF-kappaB and interferon-regulatory factor signaling pathways. *J Biol Chem.* 2010; 19:36804-36817.
14. An J, Nakajima T, Shibata H, Arimura T, Yasunami M, Kimura A. A novel link of HLA locus to the regulation of immunity and infection: NFKBIL1 regulates alternative splicing of human immune-related genes and influenza virus M gene. *J Autoimmun.* 2013; 47:25-33.
15. Chen XT, Tan JY, Lei LH, Chen LL. Cytokine levels in plasma and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis. *Am J Dent.* 2015; 28:9-12.
16. Moretti S, Bartolommei L, Galosi C, Renga G, Oikonomou V, Zamparini F, Ricci G, Borghi M, Puccetti M, Piobbico D, Eramo S, Conti C, Lomurno G, Bartoli A, Napolioni V, Romani L. Fine-tuning of Th17 Cytokines in Periodontal Disease by IL-10. *J Dent Res.* 2015; 94:1267-1275.
17. Kong F, Zheng D, She P, Ni P, Zhu H, Xu H, Su Z. *Porphyromonas gingivalis* B cell Antigen Epitope Vaccine, pIRES-ragB'-mGITRL, Promoted RagB-Specific Antibody Production and Tfh Cells Expansion. *Scand J Immunol.* 2015; 81:476-482.
18. Luo Z, Wang H, Wu Y, Sun Z, Wu Y. Clinical significance of IL-23 regulating IL-17A and/or IL-17F positive Th17 cells in chronic periodontitis. *Mediators Inflamm.* 2014; 627959.
19. Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Biguetti CC, Cavalla F, Aranha AM, Letra A, Trombone AP, Favari M, Silva RM, Garlet GP. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci.* 2014; 22:336-346.
20. Arun KV, Talwar A, Kumar TS. T-helper cells in the etiopathogenesis of periodontal disease: A mini review. *J Indian Soc Periodontol.* 2011; 15:4-10.
21. Hall BM. T Cells: Soldiers and Spies-The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015; CJN.06620714.

22. Malcolm J, Awang RA, Oliver-Bell J, Butcher JP, Campbell L, Adrados Planell A, Lappin DF, Fukada SY, Nile CJ, Liew FY, Culshaw S. IL-33 Exacerbates Periodontal Disease through Induction of RANKL. *J Dent Res*. 2015; 0022034515577815.
23. Da Luz FA, Oliveira AP, Borges D, Brígido PC, Silva MJ. The physiopathological role of IL-33: new highlights in bone biology and a proposed role in periodontal disease. *Mediators Inflamm*. 2014; 342410.
24. Beklen A, Tsaous M, G. Interleukin-1 superfamily member, interleukin-33, in periodontal diseases. *Biotech Histochem*. 2014; 89:209-214.
25. Köseoğlu S, Hatipoğlu M, Sağlam M, Enhoş S, Esen HH. Interleukin-33 could play an important role in the pathogenesis of periodontitis. *J Periodontal Res*. 2015; 50:525-534.
26. Papathanasiou E, Teles F, Griffin T, Arguello E, Finkelman M, Hanley J, Theoharides TC. Gingival crevicular fluid levels of interferon- $\gamma$ , but not interleukin-4 or -33 or thymic stromal lymphopoietin, are increased in inflamed sites in patients with periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2014; 49:55-61.
27. Buduneli N, Özçaka Ö, Nalbantsoy A. Interleukin-33 levels in gingival crevicular fluid, saliva, or plasma do not differentiate chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2012; 83:362-368.
28. Chitrapriya MN, Rao SR, Lavu V. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in different stages of inflammatory periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol* 2015; 19:14-17.
29. Banu S, Jabir NR, Mohan R, Manjunath NC, Kamal MA, Kumar KR, Zaidi SK, Khan MS, Tabrez S. Correlation of Toll-like receptor 4, interleukin-18, transaminases, and uric acid in patients with chronic periodontitis and healthy adults. *J Periodontol* 2015; 86:431-439.
30. Yoshinaka K, Shoji N, Nishioka T, Sugawara Y, Hoshino T, Sugawara S, Sasano T. Increased interleukin-18 in the gingival tissues evokes chronic periodontitis after bacterial infection. *Tohoku J Exp Med* 2014; 232:215-222.
31. Schallhorn RA, Patel DN, Chandrasekar B, Mealey BL. Periodontal disease in association with systemic levels of interleukin-18 and CXCL16 in patients undergoing cardiac catheterization. *J Periodontol* 2010;81:1180-1186.
32. Sánchez-Hernández PE, Zamora-Perez AL, Fuentes-Lerma M, Robles-Gómez C, Mariaud-Schmidt RP, Guerrero-Velázquez C. IL-12 and IL-18 levels in serum and gingival tissue in aggressive and chronic periodontitis. *Oral Dis* 2011; 17:522-529.
33. Yee M, Kim A, Alpagot T, Düzgüneş N, Konopka K. *Porphyromonas gingivalis* stimulates IL-18 secretion in human monocytic THP-1 cells. *Microbes Infect* 2012; 14:684-689.
34. Hamed M, Belibasakis GN, Cruchley AT, Rangarajan M, Curtis MA, Bostanci N. *Porphyromonas gingivalis* culture supernatants differentially regulate Interleukin-1 $\beta$  and Interleukin-18 in human monocytic cells. *Cytokine* 2009; 45:99-104.
35. Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin 18 and Periodontal Disease. *J Dent Res* 2007; 86:586-593.



36. Gillespie MT. Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function. *Arthritis Research & Therapy* 2007; 9:103-106.
37. Murray DA, Wilton JMA. Lipopolysaccharide from the Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis* Prevents Apoptosis of HL60-Derived Neutrophils In Vitro. *Infection and Immunity* 2003; 71:7232-7235.
38. Nakajima T, Ueki-Maruyama K, Oda T, Ohsawa Y, Ito H, Seymour GJ, Yamazaki K. Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *J Dent Res* 2005; 84:639-643.
39. Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Júnior WM, Rossi MA, Silva JS. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol* 2008; 84:311-318.
40. Ohshima H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamane J, Terada N. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res* 2009; 88:633-638.
41. Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res* 2010; 89:943-947.
42. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J* 2009; 54:2-10.
43. Kawahata K, Misaki Y, Yamauchi M, Tsunekawa S, Setoguchi K, Miyazaki J, Yamamoto K. Generation of CD4+ CD25+ regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in thymus and from noautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *The journal of immunology*. 2002; 168:4399-4405.
44. Nakajima T1, Ueki-Maruyama K, Oda T, Ohsawa Y, Ito H, Seymour GJ, Yamazaki K. Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *J Dent Res*. 2005;84:639-643.
45. Karlsson MR1, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+ CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med*. 2004 Jun 21; 199:1679-1688.
46. Zenobia C, Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence*. 2015; 6:236-243.
47. Tancharoen S, Matsuyama T, Kawahara K, Tanaka K, Lee LJ, Machigashira M, Noguchi K, Ito T, Imamura T, Potempa J, Kikuchi K, Maruyama I. Cleavage of host cytokeratin-6 by lysine-specific gingipain induces gingival inflammation in periodontitis patients. *PLoS One*. 2015; 10:e0117775.
48. Bengtsson T, Khalaf A, Khalaf H. Secreted gingipains from *Porphyromonas gingivalis* colonies exert potent immunomodulatory effects on human gingival fibroblasts. *Microbiol Res*. 2015; 178:18-26.
49. Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Curr Protein Pept Sci*. 2003; 4:397-407.

50. Kuula H, Salo T, Pirilä E, Tuomainen AM, Jauhiainen M, Uitto VJ, Tjäderhane L, Pussinen PJ, Sorsa T. Local and systemic responses in matrix metalloproteinase 8-deficient mice during *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis. *Infect Immun*. 2009; 77:850-859.
51. Desarda H, Gaikwad S. Matrix Metalloproteinases & Implication in Periodontitis-A Short Review. *Journal of Dental & Allied Sciences*. 2013; 2:66-70.
52. Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett*. 2012; 333:1-9.
53. Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CA. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect Immun*. 1997; 65:1980-1984.
54. Walter C, Zahlten J, Schmeck B, Schaudinn C, Hippenstiel S, Frisch E, Hocke AC, Pischon N, Kuramitsu HK, Bernimoulin JP, Suttorp N, Krüll M. *Porphyromonas gingivalis* strain-dependent activation of human endothelial cells. *Infect Immun*. 2004; 72:5910-5918.
55. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun*. 2001; 69:1477-82.
56. Coats SR1, Reife RA, Bainbridge BW, Pham TT, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at toll-like receptor 4 in human endothelial cells. *Infect Immun*. 2003;71:6799-807.
57. Underhill DM. Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol*. 2003; 33:1767-1775.
58. Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun*. 2004; 72:5041-5051.
59. Asai Y, Hashimoto M, Fletcher HM, Miyake K, Akira S, Ogawa T. Lipopolysaccharide preparation extracted from *Porphyromonas gingivalis* lipoprotein-deficient mutant shows a marked decrease in toll-like receptor 2-mediated signaling. *Infect Immun*. 2005; 73:2157-63.
60. Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco CA: Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Rev*. 2005; 29:119-144.
61. Wojtowicz H, Guevara T, Tallant, et al. Unique structure and stability of HmuY, a novel heme-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS Pathog*. 2009; 5:e1000419.
62. Bramanti TE, Holt SC. Hemin uptake in *Porphyromonas gingivalis*: Omp26 is a hemin-binding surface protein. *J Bacteriol*. 1993; 175:7413-7420.
63. Genco CA, Odusanya BM, Brown G. Binding and accumulation of hemin in *Porphyromonas gingivalis* are induced by hemin. *Infect Immun*. 1994; 62:2885-92.

64. Genco CA, Simpson W, Fornig RY, Egal M, Odusanya BM. Characterization of a Tn4351-generated heme uptake mutant of *Porphyromonas gingivalis*: evidence for the coordinate regulation of virulence factors by heme. *Infect Immun*. 1995; 63:2459-66.
65. Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Kolonay JF, Nelson WC, Mason T, Tallon L, Gray J, Granger D, Tettelin H, Dong H, Galvin JL, Duncan MJ, Dewhirst FE, Fraser CM. Complete genome sequence of the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol*. 2003; 185:5591-601.
66. Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Curr Protein Pept Sci*. 2003; 4:397-407.
67. Imamura T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*. 2003; 74:111-118.
68. Inomata M, Ishihara Y, Matsuyama T, Imamura T, Maruyama I, Noguchi T, Matsushita K. Degradation of vascular endothelial thrombomodulin by arginine- and lysine-specific cysteine proteases from *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*. 2009; 80:1511-1517.
69. Simpson W, Olczak T, Genco CA. Characterization and expression of HmuR, a TonB-dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*. 2000; 182:5737-5748.
70. Olczak T, Dixon DW, Genco CA. Binding specificity of the *Porphyromonas gingivalis* heme and hemoglobin receptor HmuR, gingipain K, and gingipain R1 for heme, porphyrins, and metalloporphyrins. *J Bacteriol*. 2001; 183:5599-5608.
71. Lewis JP, Plata K, Yu F, Rosato A, Anaya C. Transcriptional organization, regulation and role of the *Porphyromonas gingivalis* W83 hmu haemin-uptake locus. *Microbiology*. 2006; 152:3367-82.
72. Olczak T, Siudeja K, Olczak M. Purification and initial characterization of a novel *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein expressed in *Escherichia coli* and insect cells. *Protein Expr Purif*. 2006; 49:299-306.
73. Olczak T, Sroka A, Potempa J, Olczak M. *Porphyromonas gingivalis* HmuY and HmuR – further characterization of a novel mechanism of heme utilization. *Arch Microbiol*. 2008; 183:197–210.
74. Mihara J, Yoneda T, Holt SC. Role of *Porphyromonas gingivalis*-derived fibroblast-activating factor in bone resorption. *Infect Immun*. 1993; 61:3562-3564.
75. OLCZAK, T.; WOJTOWICZ, H.; CIURASZKIEWICZ, J.; OLCZAK, M. Species specificity, surface exposure, protein expression, immunogenicity, and participation in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* HmuY. *BMC Microbiol*. v.10, p.134, 2010.
76. Byrne DP, Potempa J, Olczak T, Smalley JW. Evidence of mutualism between two periodontal pathogens: co-operative haem acquisition by the HmuY haemophore of *Porphyromonas*

- gingivalis* and the cysteine protease interpain A (InpA) of *Prevotella intermedia*. Mol Oral Microbiol. 2013 Jun;28(3):219-29.
77. Zainal-Abidin Z, Veith PD, Dashper SG, Zhu Y, Catmull DV, Chen YY, Heryanto DC, Chen D, Pyke JS, Tan K, Mitchell HL, Reynolds EC. Differential proteomic analysis of a polymicrobial biofilm. J Proteome Res. 2012; 11:4449-4464.
78. Śmiga M, Bielecki M, Olczak M, Smalley JW, Olczak T. Anti-HmuY antibodies specifically recognize *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein but not homologous proteins in other periodontopathogens. PLoS One. 2015; 10:e0117508.
79. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Cerqueira EM, Galdino-Neto M, Alves H, Carvalho-Filho PC, Xavier MT, Meyer R. Induction of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. J Periodontal Res. 2012; 47:27-32.
80. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Vale VC, Galdino-Neto M, Santos HA, Carvalho-Filho PC, Stocker A, Bendicho MT, Xavier MT, Cerqueira EMM, Meyer R. *Porphyromonas gingivalis* HmuY-induced production of interleukin-6 and IL-6 polymorphism in chronic periodontitis. J Periodontol. 2013; 84:650-655.
81. Carvalho-Filho, PC. (2015). Cytokine Production and mRNA Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells under stimuli of *Porphyromonas gingivalis* rHmuY in Chronic Periodontitis. (Unpublished doctoral thesis). Federal University of Bahia, Bahia, Brazil (in portuguese).
82. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Vale VL, Galdino-Neto M, Alves H, Carvalho-Filho PC, Sampaio GP, Xavier MT, Sarmento VA, Meyer R. *Porphyromonas gingivalis* antigens differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. Arch Oral Biol. 2012; 57:314-320.
83. 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<sup>+</sup> T cells. BMC Microbiol. 2013; 13:206.

ANEXO

Carta de  
Aprovação  
No CEP-UEFS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / CEP-UEFS

Av. Universitária, S/N - Módulo I - 44.031-460 - Feira de Santana-BA  
Fone: (75) 3161-8067 Fax: (75) 224-8019 E-mail: cep.uefs@yahoo.com.br

Feira de Santana, 28 de junho de 2012  
Of. CEP-UEFS nº 145/2012

Senhor (a) Pesquisador (a): Prof. Soraya Castro Trindade

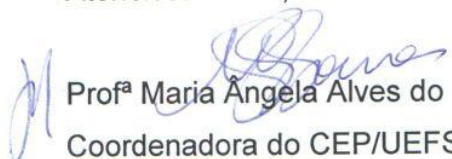
Tenho satisfação em informar-lhe que o seu Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE CÉLULAS T E ASSINATURA MOLECULAR NA PERIODONTITE CRÔNICA". registrado neste CEP sob **protocolo nº 04/2012**, foi apreciado pelos membros do CEP-UEFS e satisfaz às exigências da *Res. 196/96*. Assim, seu projeto foi **Aprovado**, podendo ser iniciada a coleta de dados com os Sujeitos da pesquisa conforme orienta o *Cap. IX.2, alínea a* – *Res. 196/96*.

Na oportunidade informo que qualquer modificação feita no projeto, após aprovação pelo CEP, deverá ser imediatamente comunicada ao Comitê, conforme orienta a *Res. 196/96, Cap. IX.2, alínea b*.

Relembro que conforme instrui a *Res. 196/96, Cap. IX.2, alínea c*, Vossa Senhoria deverá enviar a este CEP relatórios anuais de atividades pertinentes ao referido projeto e um relatório final tão logo a pesquisa seja concluída.

Em nome dos membros do CEP-UEFS, desejo-lhe pleno sucesso no desenvolvimento dos trabalhos e, em tempo oportuno, um ano **(29/06/2013)** este CEP aguardará o recebimento do seu relatório.

Atenciosamente,

  
Profª Maria Ângela Alves do Nascimento  
Coordenadora do CEP/UEFS