

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS REGULADORAS DO METABOLISMO ÓSSEO NA PERIODONTITE CRÔNICA EM FUMANTES E NÃO FUMANTES

ALINE FERREIRA DE ALMEIDA¹; ADRIANA ETGES²; ³LUIS EDUARDO RILLING DA NOVA CRUZ; ⁴JOÃO BATISTA CÉSAR NETO; ⁵FÁBIO RENATO MANZOLLI LEITE⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – gugaafa@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – aetges@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – lernovacruz@yahoo.com.br

⁴Universidade de São Paulo - jbcarneto@usp.br

⁵Universidade Federal de Pelotas leite.fabio@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença crônica que modulada pelo consumo de cigarros induz respostas imunes inatas e adaptativas dentro dos tecidos periodontais. As infecções bacterianas são detectadas pelo sistema imune inato através de receptores transmembrânicos e citosólicos (CHAMAILLARD et al., 2003). Sabe-se que o receptor do tipo Toll 4 (TLR-4) reconhece microrganismos gram-negativos e são capazes de desencadear uma cascata de sinalização intracelular resultando na secreção de mediadores, tais como a interleucina (IL-1, IL-6), fator de necrose tumoral alfa, entre outros (GARCIA DE AQUINO et al., 2009). Mais recentemente, dois membros de uma família de proteínas chamado domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos 1 e 2 (NOD-1 e NOD-2) foram encontrados para reconhecer subestruturas de peptidoglicanos bacterianos (INOHARA et al., 2003, GIRARDIN et al., 2001).

A destruição óssea vista em animais e humanos com periodontite é potencializada pelo hábito de fumar (CESAR-NETO et al., 2006). A nicotina combinada com lipopolissacarídeos (LPS) aumentou a liberação de prostaglandina E2 (PGE2), a IL-1 β e TNF- α em monócitos circulantes (PAYNE et al., 1996, RYDER, 2007) e IL-6 em fibroblastos e osteoblastos (WENDELL e STEIN, 2001). Ratos Wistar com periodontite induzida por exposição à fumaça do cigarro apresentaram níveis mais elevados de perda de massa óssea, matriz metaloproteinase 2 (MMP-2), IL-6 e interferon gama (IFN- γ) (CESAR-NETO et al., 2006).

Para avaliar estas respostas imunes, estudamos a expressão de domínios de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NOD1 e NOD2), ativador do receptor do fator nuclear kappa -B ligante (RANKL), osteoprotegerina (OPG), CD20 (células B), CD68 (monócitos/macrófagos), CD45RO (células T) e metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) nos tecidos periodontais de fumantes e não fumantes, a fim de identificar possíveis diferenças.

2. METODOLOGIA

Os tecidos gengivais foram coletados de pacientes saudáveis (n = 10) e pacientes com periodontite crônica - fumantes (n = 15) e não fumantes (n = 16). As expressões de NOD1, NOD2, RANKL, OPG, CD20, CD68 e CD45RO foram determinadas por reação de imunistoquímica (IHQ). A atividade das MMP-8 e -9 foi verificada por zimografia.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quarenta e um pacientes, que incluíram 20 homens, participaram deste estudo. Não foram observadas diferenças estatísticas para idade e sexo entre os três grupos, e para a profundidade de sondagem (PS) e perda de inserção clínica (PI) entre os dois grupos com periodontite.

A tabela abaixo mostra a distribuição da amostra de acordo com as variáveis demográficas e clínicas.

Tabela 1: Distribuição da amostra de acordo com as variáveis demográficas e clínicas

	Saudáveis	Periodontite	Periodontite
		Não fumantes	Fumantes
Idade (anos)	39.8 (\pm 5.4)	42.3 (\pm 6.7)	46.4 (\pm 7.7)
Sexo	F= 5/10	F= 8/15	F= 7/15
	M=5/10	M= 7/15	M=8/15
Profundidade da bolsa (mm)	2.1 (\pm 0.8)	7.8 (\pm 1.4)	7.9 (\pm 1.2)
Perda de inserção (mm)	0	7.6 (\pm 1.6)	7.3 (\pm 2.2)
Cigarros consumidos/dia	-	-	17 (\pm 4.1)
Anos de fumo	-	-	22.9 (\pm 12.9)

Foi observada uma diferença estatística significativa entre os grupos saudável e ambos com periodontite afetados por todas as reações de IHC e zimografia ($P < 0.001$). No entanto, não foram observadas diferenças entre fumantes e não fumantes.

Como esperado, os nossos resultados sugerem que um infiltrado inflamatório crônico é observado após o desenvolvimento da periodontite. No entanto, não foram observadas diferenças na concentração de células ou distribuição das células ao longo da bolsa periodontal entre os grupos de fumantes e não-fumantes. Levantando a hipótese de que os fumantes com periodontite têm PI maior do que os não fumante, nos estudos realizados em ratos (CESAR-NETO et al., 2006, CESAR-NETO et al., 2007) mostraram que alguns componentes do cigarro poderia estimular uma maior expressão de citocinas inflamatórias e que PI era mais associada com os mediadores expressos do que com a população e a concentração de células.

Osteoclastogenese é mediada pela interação entre as três moléculas de RANK, RANKL e OPG. OPG foi a primeira proteína a ser descrita deste eixo metabólico como um inibidor dos osteoclastos (TSUDA et al., 1997, SIMONET et al., 1997). Poucos meses depois, RANKL foi relatado como um fator de necrose tumoral capaz de estimular células dendríticas para induzir a proliferação de células T (ANDERSON et al., 1997, WONG et al., 1997). Em suma, o RANK / RANKL / OPG regulam positivamente a osteoclastogênese e a ligação RANKL/RANKL é contrabalanceada pelo OPG, um ligante natural falso para RANKL (HOFBAUER e HEUFELDER, 2001).

É importante ressaltar que as informações sobre o papel das proteínas Nod como mediadores inflamatórios de sinalização envolvidos na resposta imune inata ainda é escassa. No entanto, há evidências que destacam o seu papel na expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α tanto em células monocíticas quanto em células epiteliais (UEHARA et al., 2007, KIM et al. 2004, KOBAYASHI et al., 2005) e a modulação da expressão de citocinas através da ativação dos TLRs (NETEA et al., 2005).

Uma vez que uma mutação na proteína Nod2 está associada com a doença de Crohn em humanos com um fenótipo hiperinflamatório (INOHARA et al., 2003), e considerando que Nod maior expressão é induzida por citocinas pró-inflamatórias e LPS (GUTIERREZ et al., 2002), as proteínas Nod podem ser um potencial alvo farmacológico de novas drogas localmente administradas em bolsas periodontais.

4. CONCLUSÕES

Considerando a periodontite como uma doença infecciosa, a sua progressão pode induzir a migração de e Linfócitos T e B e monócitos/macrófagos para o local inflamado. Além disso, os receptores de reconhecimento e reguladores de remodelação óssea são superexpressos. Não foram observadas diferenças entre fumantes e não fumantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAMAILLARD, M., GIRARDIN, S. E., VIALA, J. & PHILPOTT, D. J. Nods, nalps and naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. **Cell Microbiol**, v. 5, p. 581-592, 2003.
- GARCIA DE AQUINO, S., MANZOLLI LEITE, F. R., STACH-MACHADO, D. R., FRANCISCO DA SILVA, J. A., SPOLIDORIO, L. C. & ROSSA, C., JR. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. **Life Sci**, v. 84, p. 745-754, 2009.
- INOHARA N, OGURA Y, CHEN FF, MUTO A, NUÑEZ G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. **J Biol Chem**, v.276, n.4, p.2551-2554, 2003.
- GIRARDIN SE, TOURNEBIZE R, MAVRIS M, PAGE AL, LI X, STARK GR, BERTIN J, DISTEFANO PS, YANIV M, SANSONETTI PJ, PHILPOTT DJ. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri. **EMBO Rep**, v.2, n.8, p.736-742, 2001.
- CESAR-NETO, J. B., BENATTI, B. B., SALLUM, E. A., CASATI, M. Z. & NOCITI, F. H., JR. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. **J Periodontal Res**, v. 41, p. 118-123, 2006.
- WENDELL, K. J. & STEIN, S. H. (2001) Regulation of cytokine production in human gingival fibroblasts following treatment with nicotine and lipopolysaccharide. **J Periodontol**. v. 72, p. 1038-1044, 2001.
- CESAR-NETO, J. B., DUARTE, P. M., DE OLIVEIRA, M. C., TAMBELI, C. H., SALLUM, E. A. & NOCITI, F. H., JR. Smoking modulates interleukin-6:interleukin-10 and RANKL:osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. **J Periodontal Res**, v. 42, p. 184-191, 2007.

- TSUDA, E., GOTO, M., MOCHIZUKI, S., YANO, K., KOBAYASHI, F., MORINAGA, T. & HIGASHIO, K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 234, p. 137-14, 1997.
- SIMONET, W. S., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R., KELLEY, M., CHANG, M. S., LUTHY, R., NGUYEN, H. Q., WOODEN, S., BENNETT, L., BOONE, T., SHIMAMOTO, G., DEROSE, M., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., TAN, H. L., TRAIL, G., SULLIVAN, J., DAVY, E., BUCAY, N., RENSHAW-GEGG, L., HUGHES, T. M., HILL, D., PATTISON, W., CAMPBELL, P., SANDER, S., VAN, G., TARPLEY, J., DERBY, P., LEE, R. & BOYLE, W. J. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell.** v. 89, p. 309-319, 1997.
- ANDERSON, D. M., MARASKOVSKY, E., BILLINGSLEY, W. L., DOUGALL, W. C., TOMETSKO, M. E., ROUX, E. R., TEEPE, M. C., DUBOSE, R. F., COSMAN, D. & GALIBERT, L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. **Nature**, n. 390, p. 175-179, 1997.
- WONG, B. R., RHO, J., ARRON, J., ROBINSON, E., ORLINICK, J., CHAO, M., KALACHIKOV, S., CAYANI, E., BARTLETT, F. S., 3RD, FRANKEL, W. N., LEE, S. Y. & CHOI, Y. Trance is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. **J Biol Chem.** v. 272, p. 25190-25194, 1997.
- HOFBAUER LC, HEUFELDER AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. **J Mol Med (Berl)**, v.79, n.5-6, p.243-253, 2001.
- UEHARA, A., FUJIMOTO, Y., FUKASE, K. & TAKADA, H. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. **Mol Immunol.** v. 44, p. 3100-3111, 2007.
- KIM, J. G., LEE, S. J. & KAGNOFF, M. F. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. **Infect Immun.** v. 72, p. 1487-1495, 2004.
- KOBAYASHI, K. S., CHAMAILLARD, M., OGURA, Y., HENEGARIU, O., INOHARA, N., NUNEZ, G. & FLAVELL, R. A. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. **Science.** v. 307, p. 731-734, 2005.
- NETEA, M. G., FERWERDA, G., DE JONG, D. J., JANSEN, T., JACOBS, L., KRAMER, M., NABER, T. H., DRENTH, J. P., GIRARDIN, S. E., KULLBERG, B. J., ADEMA, G. J. & VAN DER MEER, J. W. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. **J Immunol.** v. 174, 6518-6523, 2005.
- GUTIERREZ, O., PIPAON, C., INOHARA, N., FONTALBA, A., OGURA, Y., PROSPER, F., NUNEZ, G. & FERNANDEZ-LUNA, J. L. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. **J Biol Chem**, v. 277, p. 41701-41705, 2002.