

Evaluación del cambio en la expresión de genes en tejido de pulpa con y sin caries dental: una aproximación in silico

Evaluation of the change in gene expression in pulp tissue with and without dental caries: in silico analysis

Melissa Espinosa¹, Julio César Osorio²

RESUMEN

La caries es enfermedad infecciosa compleja caracterizada por desmineralización y destrucción de los tejidos duros del diente. La inflamación subsecuente de la pulpa puede estar acompañada de daño de los tejidos. Por medio de análisis bioinformáticos utilizando bases de datos curadas y de acceso libre se determinó las posibles rutas metabólicas que se activan en un proceso de caries con afectación de la pulpa del diente. Los datos fueron obtenidos desde un experimento GEO (NCBI) y las rutas metabólicas por medio de la página web de REACTOME.

Palabras Clave: Sonic hedgehog, in-silico, bioinformática, SNP, sustitución aminoácidos

ABSTRACT

Caries is a complex infectious disease characterized by demineralization and destruction of the hard tissues of the tooth. Subsequent swelling of the pulp may be accompanied by tissue damage. The goal was to make a bioinformatic analysis using databases for to access possible metabolic pathways that were activated in a caries process with involvement of the pulp of the tooth were determined. Data was obtained from a GEO publication (NCBI) and metabolic pathways through the REACTOME website.

Keywords: Sonic hedgehog, in-silico, bioinformatics, SNP, amino acid substitution

Grupo de Investigación - Ciencias Odontológicas UNICOC

1. Estudiante 1 año del programa de Odontología, Santiago de Cali.

2. Biólogo, Maestría en Ciencias con énfasis en Genética

Autor responsable de correspondencia: Julio César Osorio

Correo electrónico: jcosorio@unicoc.edu.co

Citar como: Espinosa M, Osorio JC. Evaluación del cambio en la expresión de genes en tejido de pulpa con y sin caries dental: una aproximación in silico. Journal Odont Col. 2016;9(18):38-41

Recibido: Agosto 2016, aceptado: Octubre 2016

INTRODUCCIÓN

El diente expuesto al medio bucal es susceptible de enfermar por caries, enfermedad infecciosa compleja caracterizada por desmineralización y destrucción de los tejidos duros del diente que expone la superficie dentinal al medio bucal y a los gérmenes, provocando inflamación, migración celular hacia la zona basal, vasodilatación y exudado, que originan dolor.¹

El patrón de la inflamación en el diente afectado por el ataque de caries está determinado por la permeabilidad de la dentina y la proximidad de la lesión cariosa a la pulpa.² La acumulación de células inflamatorias crónicas inmunológicamente competente se relaciona con los cambios regresivos en la capa de odontoblastos debajo de la lesión.²

Los microorganismos posteriormente desencadenan respuestas inflamatorias en la pulpa dental. Con la inflamación crónica, a pesar del tratamiento, las dinámicas se direccionan hacia la pérdida permanente de tejido normal y la reducción de las capacidades de reparación innatas.

Con el objetivo de conocer más sobre las rutas metabólicas relacionadas con los daños de la pulpa dental desde procesos cariogénicos se evaluó bioinformáticamente la expresión de genes reportada en la base de datos curada GEO (NCBI).

METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda en Gene Expression Omnibus que hace parte del National Center for Biotechnology Information de los Estados Unidos. El objetivo de la búsqueda fue identificar los cambios de expresión de genes en un experimento con muestras de tejido de pulpa con caries y otro tejido de pulpa libre de caries. Para tal fin, se construyó el siguiente algoritmo de búsqueda (“caries”[MeSH Terms] AND (“pulpal”[MeSH Terms] AND (“tissue”[MeSH Terms]). Los resultados obtenidos de investigaciones del GEO fueron depurados por medio de los siguientes criterios: el primer criterio de selección fue que la base de datos reportara la aplicación GEO2R la cual tiene la capacidad operativa de comparar dos o más grupos de muestras con el fin de identificar los genes que están significativamente expresados a través de las condiciones de sus respectivos experimentos. El segundo criterio de selección fue la lectura del resumen haciendo énfasis en el diseño general del experimento lo que permitió escoger los experimentos del GEO enfocados a evaluar los cambios de expresión de los genes en tejido de pulpa sano y con caries. Una

vez seleccionados los experimentos GEO2R se procedió a formar dentro de la plataforma los grupos de comparación. En general se buscaba el grupo control del experimento y los diferentes grupos experimentales. Se realizó entonces el análisis del top 250 de genes que avaluó los cambios de expresión (alta o baja) de este grupo de genes. Se configuró los resultados de la expresión de estos genes con cuatro variables de salida: identificación (ID), p-valor, el logaritmo de las veces de cambio en la expresión de los genes (LogFC) y el símbolo del gen (gene symbol). A partir de aquí comenzó la depuración de la información que fue recolectada en una hoja de cálculo de Excel. Los datos fueron depurados al eliminar aquellos que no tuvieran el símbolo del gen. Todos los datos con un p-valor mayor a 0.05 fueron eliminados.

Por último se eliminaron aquellos datos que tuvieran un LogFC menores que 1 y mayores a -1. Para el análisis de la redes de este conjunto de datos de expresión de genes se utilizó la interfaz del programa REACTOME (<http://www.reactome.org/Pathway-Browser/#TOOL=AT>). Este programa utiliza genes y rutas metabólicas de referencia y por medio de la probabilidad de comparación múltiple determina su afinidad con los datos.

RESULTADOS

Se obtuvieron 5 resultados de experimentos de GEO al usar el algoritmo. De estos solo uno fue elegido al tener la aplicación GEO2R. Al realizar la lectura del diseño del experimento este tenía relación con la evaluación de la expresión de tejidos de pulpa con caries y sin caries. (Tabla 1)

Para el GEO GSE1629, se agruparon los datos utilizando el GEO2R en tejido de pulpa con caries y tejido de pulpa sin caries (grupo control). Los datos del cambio de expresión (logFC) con respecto al número de genes evaluados se visualizan en la Figura 1.

Los datos del cambio de la expresión (LogFC) del GEO GSE1629 se agruparon en genes sobreexpresados (logFC>1) y genes con expresión disminuida (LogFC<1). En la tabla 2 se muestran los datos con baja expresión (LogFC<1).

Tabla 1		
Artículos seleccionados desde la base de datos GEO (NCBI)		
Autor	Acceso GEO	Citación
McLachlan JL, Smith AJ, Bujalska IJ, Cooper PR	GSE1629	PMID: 15869869

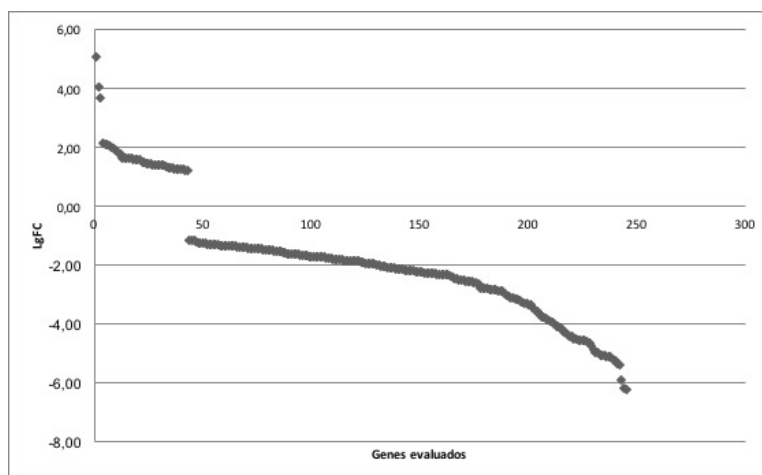


Figura 1

Niveles de expresión de tejidos de pulpa con caries y sin caries. Datos analizados utilizando GEO2R del experimento GEO GSE1629

Tabla 2.

Resultados de la agrupación de los genes con sobre expresión (logFC>1) desde la interfaz de la página web de REACTOME

Nombre de la ruta metabólica	FDR
Señalización del receptor de prolactina	8.03×10^{-4}
Señalización del receptor de la hormona de crecimiento	$2,5 \times 10^{-3}$
Señalización nuclear por ERBB4	$1,72 \times 10^{-2}$
Translocación de ZAP para sinapsis inmunológica	$9,74 \times 10^{-12}$
Señalización PD-1	$9,74 \times 10^{-12}$
Fosforilación de CD3 y cadena zeta TCR	$9,36 \times 10^{-11}$

DISCUSIÓN

Al agrupar los datos de sobre expresión desde el experimento GEO GSE1629 en la página web REACTOME se encontró una probabilidad de comparación múltiple (FDR) de 8.03×10^{-4} para la ruta metabólica de señalización del receptor de prolactina (PRL); esta es una hormona y un neuromodulador. Se sensibiliza por medio de la activación del canal catiónico transitorio potencial miembro del receptor V de la subfamilia 1 (TRPV1) en respuesta a neuronas sensoriales.³ La PRL juega un papel en la hipersensibilidad a los estímulos dolorosos,⁴⁻⁶ en los que la acción de PRL en las neuronas puede ser aguda / transitoria o largo plazo.

Por otro lado, la PRL funciona como una proteína de fase aguda soluble que se une al lipopolisacárido bacteriano (o LPS) para inducir la respuesta inmune mediante la presentación de la LPS a los receptores de reconocimiento de patrones de la superficie celular (CD14 y TLR4).⁷ Este proceso con frecuencia es responsable de las reacciones inflamatorias destructivas del tejido.⁸ La probabilidad de comparación múltiple (FDR) de $2,5 \times 10^{-3}$ para la ruta metabólica de seña-

lización del receptor de la hormona de crecimiento, la cual se relaciona con el aumento en la formación de hueso y de los tejidos duros del diente (dentina, cemento y esmalte), al igual que las proteínas morfogenéticas óseas. Los receptores de la hormona de crecimiento se expresan en estos tejidos y podrían mediar respuestas de crecimiento locales.⁹

La probabilidad de comparación múltiple (FDR) de $1,72 \times 10^{-2}$ para la ruta metabólica de señalización nuclear por ERBB4. Este es un receptor tirosina quinasas (ErbB4) con un papel importante en la morfogénesis dental.¹⁰

Al agrupar los datos de baja expresión desde el experimento GEO GSE1629 en la página web REACTOME se encontró una probabilidad de comparación múltiple (FDR) de $9,74 \times 10^{-12}$ para la translocación de ZAP para la sinapsis inmunológica. Esta ruta permite la activación de macrófagos por CD14 y la vía de I κ B cinasas o las ZAP cinasas para activar los factores de transcripción NF- κ B y AP-118 para la producción de diversas citocinas como la IL-1, IL-6, IL-8 o TNF.¹¹⁻¹² La probabilidad de comparación múltiple (FDR) de

$9,74 \times 10^{-12}$ para la ruta metabólica del receptor de muerte celular (PD-1). PD-ligando (PD-L) es otra vía de la red principal de receptor-ligando que funciona principalmente para proporcionar una señal co-inhibitoria. PD1: PD-L interacciones mantener la tolerancia periférica y son explotados por los tumores y los virus que causan la infección crónica y que buscan evadir la erradicación por parte del sistema inmunológico.¹³

La probabilidad de comparación múltiple (FDR) de $9,74 \times 10^{-11}$ para la ruta metabólica de fosforilación de CD3 y cadena Z de receptor de las células T (TCR). El descenso de regulación de expresión de la cadena Z de TCR está asociado con disfunción de las células T y se ha descrito en diversas patologías, tales como cáncer avanzado,¹⁴⁻¹⁵ infecciones crónicas,^{16, 17} y las enfermedades autoinmunes.¹⁸⁻²⁰

CONCLUSIONES

Por medio de análisis bioinformáticos en plataformas curadas y de acceso libre se pueden proponer rutas metabólicas en procesos tan comunes como la caries dental. En este análisis se proponen rutas como la vía de la prolactina que con sus genes en alza pueden explicar la reacción que tiene el sistema inmune a la presencia de los lípidos de membrana de las bacterias. Además, como el descenso de la expresión de la cadena Z de TCR se relaciona con la presencia de enfermedades crónicas.

REFERENCIAS

- Kohli, A., Pezzotto, S. M., Poletto, L., & Dávila, H. (2014). Carious measurement and pulps modifications in rats undergoing habitual and cariogenic diets treated with collagenase type ii. *Revista Ciencias Morfológicas*, 16(1).
- Trowbridge, H. O. (1981). 2. Pathogenesis of pulpitis resulting from dental caries. *Journal of endodontics*, 7(2), 52-60.
- Phoebe E. Scotland, Mayur Patil, Sergei Belugin, Michael A. Henry, Vincent Goffin, Kenneth M. Hargreaves, Armen N. Akopian, Endogenous prolactin generated during peripheral inflammation contributes to thermal hyperalgesia, *European Journal of Neuroscience*, 2011, 34, 5, 745
- Patil M. J., Ruparel S. B., Henry M. A., Akopian A. N. (2013) Prolactin regulates TRPV1, TRPA1, and TRPM8 in sensory neurons in sex-dependent manner: contribution of prolactin receptor to inflammatory pain. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*
- Patil M. J., Green D. P., Henry M. A., Akopian A. N. (2013) Sex-dependent roles of prolactin and prolactin receptor in postoperative pain and hyperalgesia in mice. *Neuroscience* 253, C132-C141
- Scotland P. E., Patil M., Belugin S., Henry M. A., Goffin V., Hargreaves K. M., Akopian A. N. (2011) Endogenous prolactin generated during peripheral inflammation contributes to thermal hyperalgesia. *Eur. J. Neurosci.* 34, 745-754
- Muta T, Takeshige K (2001). "Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations". *Eur. J. Biochem.* 268 (16): 4580-9.
- Choi, S.; Baik, J.E.; Jeon, J.H.; Cho, K.; Seo, D.-G.; Kum, K.-Y.; Yun, C.-H.; Han, S.H. Identification of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-binding proteins in human saliva. *Mol. Immunol* 2011, 48, 2207-2213.
- Li, H., Bartold, P. M., Zhang, C. Z., Clarkson, R. W., Young, W. G., & Waters, M. J. (1998). Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor I Induce Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4: A Mediator Role in Bone and Tooth Formation? 1. *Endocrinology*, 139(9), 3855-3862.
- Fried, K., Risling, M., Tidcombe, H., Gassmann, M., & Lillesaar, C. (2002). Expression of ErbB3, ErbB4, and neuregulin-1 mRNA during tooth development. *Developmental dynamics*, 224(3), 356-360.
- Thomas CJ, Kapoor M, Sharma S, Bausinger H, Zyilan U, Lipsker D, et al. Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response. *FEBS Lett* 2002;531:184-188.
- Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu M, Nishijima MP, et al. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1994;1:509-516
- Riella, L. V., Paterson, A. M., Sharpe, A. H., & Chandraker, A. (2012). Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response. *American Journal of Transplantation*, 12(10), 2575-2587.
- Riccobon, A., R. Gunelli, R. Ridolfi, F. De Paola, E. Flamini, M. Fiori, C. Saltutti, M. Petrini, L. Fiammenghi, M. Stefanelli, et al. 2004. Immunosuppression in renal cancer: differential expression of signal transduction molecules in tumor-infiltrating, near-tumor tissue, and peripheral blood lymphocytes. *Cancer Invest.* 22: 871-877.
- Finke, J. H., A. H. Zea, J. Stanley, D. L. Longo, H. Mizoguchi, R. R. Tubbs, R. H. Wiltout, J. J. O'Shea, S. Kudoh, E. Klein, et al. 1993. Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 53: 5613-5616
- Trimble, L. A., and J. Lieberman. 1998. Circulating CD8 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals have impaired function and downmodulate CD3, the signaling chain of the T-cell receptor complex. *Blood* 91: 585-594.
- Zea, A. H., M. T. Ochoa, P. Ghosh, D. L. Longo, W. G. Alvord, L. Valderrama, R. Falabella, L. K. Harvey, N. Saravia, L. H. Moreno, and A. C. Ochoa. 1998. Changes in expression of signal transduction proteins in T lymphocytes of patients with leprosy. *Infect. Immun.* 66: 499-504.
- Berg, L., J. Ronnelid, L. Klareskog, and A. Bucht. 2000. Down-regulation of the T cell receptor CD3 chain in rheumatoid arthritis (RA) and its influence on T cell responsiveness. *Clin. Exp. Immunol.* 120: 174-182.
- Maurice, M. M., A. C. Lankester, A. C. Bezemer, M. F. Geertsma, P. P. Tak, F. C. Breedveld, R. A. van Lier, and C. L. Verweij. 1997. Defective TCR-mediated signaling in synovial T cells in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 159: 2973-2978.
- Liou, S. N., X. Z. Ding, G. J. Dennis, and G. C. Tsokos. 1998. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus: deficient expression of the T cell receptor chain. *J. Clin. Invest.* 101: 1448-1457.