

## **Avaliação do perfil transcriptômico do *A. actinomycetemcomitans* após o tratamento periodontal em pacientes com periodontite grau C**

**Palavras-Chave: DOENÇAS PERIODONTAIS, MICROBIOLOGIA, EXPRESSÃO GÊNICA.**

**Autores/as:**

**MATHEUS PASCHOALETTO LOPES [FOP - UNICAMP]**

**Prof. Dr. RENATO CORRÊA VIANA CASARIN (orientador) [FOP - UNICAMP]**

---

### **INTRODUÇÃO:**

A periodontite é uma doença inflamatória de etiologia multifatorial, desencadeada pela resposta imune-inflamatória do hospedeiro aos periodontopatógenos presentes no biofilme subgingival, caracterizada clinicamente pela destruição óssea e perda de inserção conjuntiva, que se não tratada pode levar à perda dos dentes. A Academia Americana de Periodontia classificava, até 2018, duas formas principais de periodontite: a periodontite crônica (PC) e a periodontite agressiva (PA). Enquanto a PC tem prevalência maior, progressão lenta, afetando geralmente adultos, e apresenta boa resposta à descontaminação mecânica, a PA é uma forma particularmente grave de doença periodontal, acomete indivíduos sistemicamente saudáveis, e é caracterizada por início precoce, rápida progressão, agregação familiar dos casos e pobre resposta as abordagens terapêuticas (Albandar 2014a; 2014b; Armitage, 1999; Deas DE, Mealey BL, 2010). Entretanto, recentemente foi indicada uma nova abordagem classificatória onde a Periodontite se divide em estágio e graus (estágio I, II, III e IV; grau A, B e C), de acordo com a progressão e severidade da doença.

Várias características microbiológicas têm sido fortemente associadas às diversas formas de doença periodontal. Nosso grupo de pesquisa comparou anteriormente a reclassificação, a microbiota subgingival de pacientes com PC e PA e observou diferenças na colonização bacteriana, onde o grupo PA apresentou maiores contagens de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Porphyromonas gingivalis* (Pg) comparando com o grupo PC bem como alterações imunoinflamatórias (Casarin et al., 2010). Essas diferenças microbiológicas encontradas e corroboradas com vários outros estudos (Cortelli et al., 2005; Gajardo et al., 2005; Könönen E, Müller HP, 2014) nas duas formas de doença periodontal podem ajudar a entender diferenças na patogenicidade.

Assim, através do biofilme coletado *in vivo*, pôde-se avaliar o transcriptoma do biofilme periodontal nos indivíduos com Periodontite Grau C, antes e após tratamento, identificando vias específicas e a ocorrência dessas alterações em indivíduos jovens, aumentando o conhecimento dessa condição. Sabe-se que o agente *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) é uma das principais bactérias associadas à

Periodontite Grau C e o objetivo do presente projeto foi avaliar a expressão diferencial dos genes dessa bactéria alvo nos dois tempos.

## **METODOLOGIA:**

Foram selecionados 3 pacientes que procuraram tratamento na clínica de Extensão/Pós-Graduação da área de Periodontia da FOP/UNICAMP segundo os seguintes critérios de inclusão: 1) Pacientes maiores que 18 anos e menores que 35 anos; 2) Diagnóstico de periodontite agressiva generalizada, de acordo com a American Academy of Periodontology - AAP, 1999 (confirmada pela presença de bolsas periodontais e perda óssea radiográfica em pacientes com idade inferior a 35 anos no momento da realização do diagnóstico); 3) Presença de pelo menos 15 dentes na cavidade oral; 4) Presença de pelo menos 6 dentes que contenham 6 sítios profundos ( $\geq 7$  mm), os quais não se localizem em áreas de bifurcação; 5) Apresentar menos de 20% de índice de placa (IP) e de sangramento à sondagem (SS); 6) Consentimento formal para a participação na pesquisa, após a explicação dos riscos e benefícios por indivíduo envolvido na mesma.

Foram excluídos os pacientes que apresentavam as seguintes condições: 1) Alteração periapical ou pulpar; 2) Alteração sistêmica ou uso de medicamentos (6 meses anteriores ao estudo) que pudessem influenciar na resposta ao tratamento periodontal; 3) Grávidas e lactantes; 4) Realização de tratamento periodontal incluindo instrumentação subgengival nas 6 semanas anteriores ao estudo; 5) Dentes com envolvimento de bifurcação; 6) Dentes com mobilidade acentuada; 7) Patologias orais; 8) Histórico de alergia a qualquer componente do estudo; 9) Cirurgia periodontal prévia na região de interesse; 10) Usuários crônicos de álcool.

Foi realizado um estudo longitudinal no qual a variável de interesse primária era a expressão de genes antes e após a terapia mecânica associada à antibioticoterapia sistêmica. Dessa forma, os pacientes foram tratados na seguinte sequência:

- 1. Terapia inicial:** Todos os pacientes foram instruídos sobre as causas e consequências da doença periodontal bem como sobre técnicas preventivas, incluindo técnica de escovação sulcular e uso de fio dental. Foram fornecidas aos indivíduos escovas macias em conjunto a um dentífrico fluoretado. Foi realizada remoção profissional de biofilme e cálculo supragengival, além de fatores de retenção de biofilme quando necessário.

Os parâmetros clínicos coletados foram: 1) Índice de Placa- IP (Ainamo e Bay, 1975): Avaliação da presença/ausência de placa num padrão binomial. Número de faces envolvidas com placa divididas pelo número de faces presentes em todos os dentes do paciente. 0- Ausência de placa visível; 1- Presença de placa visível. 2) Sangramento à Sondagem – SS (Mühlemann e Son, 1971): padrão dicotômico. 0- Ausência de sangramento; 1- Presença de sangramento. 3) Nível de Inserção Clínico - NIC: distância entre a JCE e a porção mais coronal do epitélio juncional, ou fundo da bolsa periodontal. 4) Recessão Gengival – RG: deslocamento apical da margem gengival em relação à junção cimento esmalte. 5) Profundidade de sondagem (NIC - RG): distância da margem gengival à base, clinicamente detectável, da bolsa periodontal.

**2. Tratamento periodontal básico:** A realização de instrumentação periodontal subgingival foi realizada em todos os dentes que apresentaram indicação, por meio de raspagem manual com o uso de curetas (Hu-friedy, Chicago, IL- EUA) e ultrassônica (Cavitron, Dentsply, Rio de Janeiro-BR), utilizando inserto Universal 30 KHZ (Hu-friedy, Chicago, IL- EUA). A raspagem foi realizada seguindo o protocolo de Desinfecção Ultrassônica de Boca-toda (Casarin et al, 2013). Ao final da terapia mecânica, os pacientes receberam dois frascos contendo cápsulas/comprimidos a serem ingeridos como descrito: uma cápsula de Amoxicilina 500 mg + um comprimido de Metronidazol 400mg, a cada 8 horas, por 10 dias.

Posteriormente à fase ativa do tratamento, os pacientes foram incluídos em terapia de suporte com controles quinzenais no primeiro mês e mensais, até o final do estudo, sempre associado com orientação de higiene e profilaxia.

As coletas do biofilme subgingival foram realizadas no baseline e nos mesmos sítios após 3 meses do procedimento. A área foi devidamente isolada com rolos de algodão esterilizados. A porção supragengival do biofilme foi removida, e então foi removida uma porção do biofilme subgingival através de curetas periodontais (Hu-friedy, Chicago, IL- EUA), e acondicionados em meio *RNAlater*. O RNA total foi extraído através do protocolo kit de extração específico (RNAeasy Mini Kit, Valencia, CA) associado com uma adição prévia dos seguintes buffers de extração:

Lisozima 20mg/ml (Thermo Fischer Scientific, MA) + Mutanolisina 5,000U/ml (Thermo Fischer Scientific, MA) + Tris -1M HCl, pH 8.0. O RNA extraído foi armazenado em freezer a -80°C até o sequenciamento do RNA.

Antes do sequenciamento, as amostras foram re-analisadas quanto à qualidade e pureza, no aparelho Bioanalyzer, necessitando de um RIN adequado e concentração mínima, como mostra a figura acima (Figura 1). Após determinar quantidade e qualidade, as amostras passaram pelo tratamento com RIBO0 (Ribo-Zero; Gold Epidemiology Kit, Illumina) que remove rRNA mitocondrial de humano/animal e de micro-organismos unicelulares, resultando em uma amostra com RNAm com maior pureza. As amostras foram então tratadas para inclusão de tags, clusterizadas e sequenciadas 2 x 100 no equipamento HiSeq2500. A partir do sequenciamento, foi iniciada a análise de bioinformática, realizada pela Dra. Melline Fontes (Core for Research Informatics- University of Illinois at Chicago – UIC). O pipeline utilizado inclui a leitura das sequências no software FastQC (Andrews 2010), o tratamento de qualidade das sequências pelos softwares Fastx clipper 0.0.12 (the FASTX-toolkit) Trimmomatic 0.38 (Bolger et al, 2014), utilizando

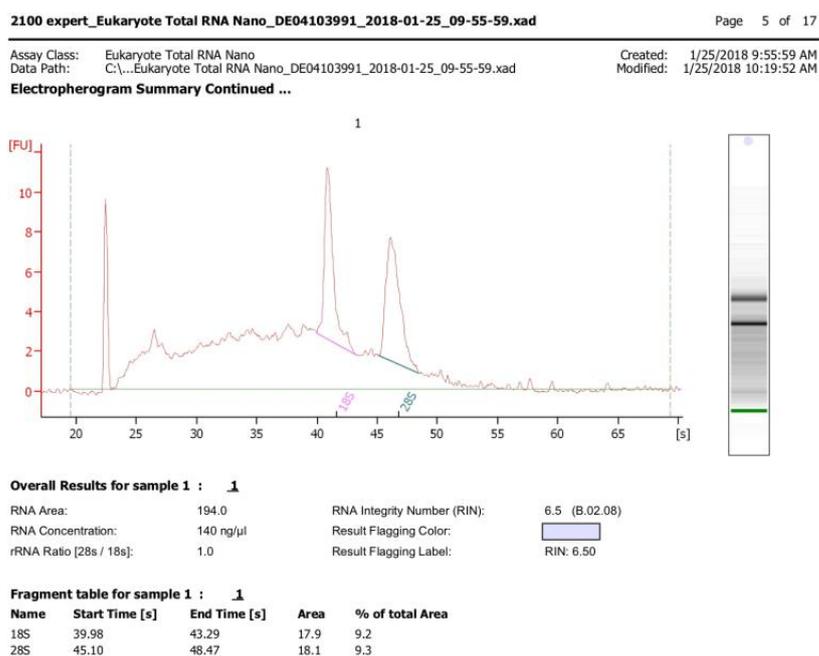


Figura 1 Análise da amostra de RNA analisada pelo Bioanalyzer.

parâmetros de análise: ILLUMINACLIP:2:30:10, LEADING:15, TRAILING:15, SLIDINGWINDOW:4:20 e MINLEN:50. A remoção de rRNA residual foi realizada pelo software SortMeRNA 2.1 e do genoma humano residual pelo Bowtie2. Os dados do transcriptoma foram mapeados contra um genoma de referência do *A. actinomycetemcomitans* utilizando a ferramenta HISAT2. A montagem do genoma foi realizada pelo programa Stringtie e a quantificação dos transcritos pelo Kallisto. A análise de expressão diferencial entre os grupos baseline e pós-tratamento foi realizada com a ferramenta Sleuth.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Clinicamente, os pacientes do estudo apresentaram reduções significativas ( $p < 0.05$ ) nos parâmetros de: profundidade de sondagem ( $3,69 \pm 1,78$  baseline versus  $2,98 \pm 1,70$  pós-tratamento); profundidade de sondagem do sítio coletado ( $6,29 \pm 0,95$  baseline versus  $3,29 \pm 0,95$  pós-tratamento); e sangramento à sondagem ( $0,54 \pm 0,50$  baseline versus  $0,29 \pm 0,46$  pós-tratamento). A redução significativa desses valores após 3 meses utilizando essa posologia de antibiótico em pacientes com esse perfil de doença periodontal também foi encontrada como sendo significativa em resultados prévios anteriores (Casarin et al., 2012).

A análise de expressão diferencial mostrou que não houve diferenças nos transcritos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre os dois grupos. A análise linear discriminante (LDA) mostrou um padrão de expressão no baseline característico pela expressão de dois transcritos em cada grupo (Figura 2). Os transcritos do baseline parecem estar mais expressos com o metabolismo de ácidos nucleicos, bem como regulação do DNA e RNA (Ofengand, 2002). Enquanto isso, os transcritos mais associados com o pós-tratamento parecem estar relacionados com o metabolismo de lactato (Hwang et al., 2013) e metabolismo de proteínas de ligação (Barnett et al., 2003).

Apesar desse estudo não ter avaliado quantitativamente e proporcionalmente o efeito do tratamento nas concentrações de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a literatura mostra que a combinação antibiótica de amoxicilina + metronidazol como adjunto a raspagem e alisamento radicular promove redução significativa desse patógeno no biofilme subgingival (Casarin et al., 2012; Aimetti et al., 2012), e a redução na proporção dessa espécie

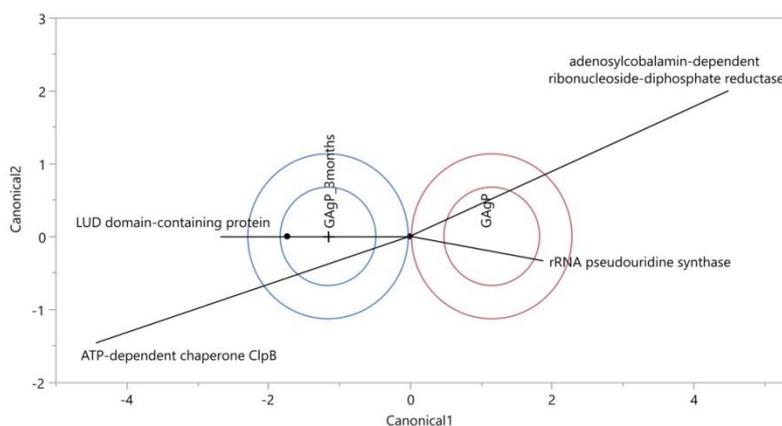


Figura 2: Análise linear discriminante dos transcritos associados com *A. actinomycetemcomitans* antes e depois do tratamento periodontal.

pode estar relacionado até mesmo com os benefícios clínicos obtidos (Guerrero et al., 2014). Em conjunto com os achados de manutenção da expressão gênica nesse estudo, pode ser hipotetizado que os benefícios clínicos obtidos após a terapia periodontal podem estar relacionados à redução quantitativa desse patógeno, mesmo que ele ainda mantenha uma expressão semelhante após o tratamento.

Levando em consideração que a periodontite é uma doença polimicrobiana e que o ecossistema subgingival é altamente complexo e dinâmico, a alteração na proporção de determinadas espécies bacterianas pode influenciar na dinâmica de colonização de outras espécies e aumento do potencial de virulência dessas, ou seja, através de uma ação indireta (Hajishengallis, Lamont, 2012). Dessa forma, o

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pode atuar como sendo uma dessas espécies que podem agir sinergicamente com outras espécies, promovendo interações metabólicas com outros membros da comunidade subgengival e aumentando o potencial de virulência de maneira indireta (Hajishengallis, Lamont, 2016). Isso explicaria, por exemplo, o impacto da redução desse patógeno na melhoria dos parâmetros clínicos após o tratamento.

## CONCLUSÃO:

Independente do debridamento mecânico associado à antibioticoterapia em pacientes com periodontite grau C, o *A. actinomycetemcomitans* mantém seu perfil de expressão gênica.

---

## REFERÊNCIAS

- Albandar, J. M. (2014a) Aggressive and acute periodontal diseases. *Periodontol* 2000 65, 7-12. doi:10.1111/prd.12013.
- Albandar, J. M. (2014b) Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Periodontol* 2000 65, 13-26. doi:10.1111/prd.12014.
- Andere NMRB, Castro Dos Santos NC, Araujo CF, Mathias IF, Taiete T, Casarin RCV, Jardini MAN, Shaddox LM, Santamaria MP. Clarithromycin as an Adjunct to One-Stage Full-Mouth Ultrasonic Periodontal Debridement in Generalized Aggressive Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol*. 2017 Dec;88(12):1244-1252. doi: 10.1902/jop.2017.170165. Epub 2017 Jul 3. PMID: 28671507.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4, 1-6. doi:10.1902/annals.1999.4.1.1.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24695404; PMCID: PMC4103590.
- Casarin, R. C., Ribeiro Edel, P., Mariano, F. S., Nociti, F. H., Jr., Casati, M. Z. & Goncalves, R. B. (2010) Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontol Res* 45, 635-642. doi:10.1111/j.1600-0765.2010.01278.x.
- Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32:860–866.
- Deas DE, Mealey BL. Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment. *Periodontol* 2000. 2010 Jun;53:154-66. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00334.x. PMID: 20403111.
- Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A, Gamonal J. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol*. 2005 Feb;76(2):289-94. doi: 10.1902/jop.2005.76.2.289. PMID: 15974855.
- Könönen E, Müller HP. Microbiology of aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000. 2014 Jun;65(1):46-78. doi: 10.1111/prd.12016. PMID: 24738586.
- Casarin, R.C., Peloso Ribeiro, É.D., Sallum, E.A., Nociti, F.H., Jr., Gonçalves, R.B. and Casati, M.Z. (2012), The Combination of Amoxicillin and Metronidazole Improves Clinical and Microbiologic Results of One-Stage, Full-Mouth, Ultrasonic Debridement in Aggressive Periodontitis Treatment. *Journal of Periodontology*, 83: 988-998. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.110513>
- Aimetti, M., Romano, F., Guzzi, N., & Carnevale, G. (2012). Full-mouth disinfection and systemic antimicrobial therapy in generalized aggressive periodontitis: a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of clinical periodontology*, 39(3), 284–294. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01795.x>
- Guerrero, A., Nibali, L., Lambertenghi, R., Ready, D., Suvan, J., Griffiths, G. S., Wilson, M., & Tonetti, M. S. (2014). Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial. *Journal of clinical periodontology*, 41(11), 1080–1089. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12299>
- Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the Polymicrobial Synergy and Dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*. 2012;27:409–419
- Hajishengallis G, Lamont RJ. Dancing with the Stars: How Choreographed Bacterial Interactions Dictate Nosymbiocy and Give Rise to Keystone Pathogens, Accessory Pathogens, and Pathobionts. *Trends Microbiol*. 2016;24(6):477-489. doi:10.1016/j.tim.2016.02.010
- Andrews, S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. (2010). Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Ofengand, James(2002), Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases, *FEBS Letters*, 514, doi: 10.1016/S0014-5793(02)02305-0
- Hwang, W.C., Bakolitsa, C., Punta, M. et al. LUD, a new protein domain associated with lactate utilization. *BMC Bioinformatics* 14, 341 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-341>
- Barnett ME, Zolkiewska A, Zolkiewski M. Structure and activity of ClpB from *Escherichia coli*. Role of the amino- and carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem*. 2000;275(48):37565-37571. doi:10.1074/jbc.M005211200