ESTELA SANCHES REBEIS

Determinação da resposta de imunoglobulina G sérica contra Omp29 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em pacientes portadores de periodontite agressiva

São Paulo

2018

ESTELA SANCHES REBEIS

Determinação da resposta de imunoglobulina G sérica contra Omp29 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em pacientes portadores de periodontite agressiva

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Profa. Dra. Luciana Saraiva

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rebeis, Estela Sanches.
Determinação da resposta de imunoglobulina G sérica contra Omp29 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em pacientes portadores de periodontite agressiva/ Estela Sanches Rebeis; orientador Luciana Saraiva -- São Paulo, 2018.

83 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Sorotipos. 2. Proteína de membrana externa – 29kDa. 3. Aggregatibacter actinomycetemcomitans. 4. Periodontite Agressiva. I. Saraiva, Luciana. II. Título.

Rebeis Determinação da resposta de imunoglobulina G sérica contra Omp29 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em pacientes portadores de periodontite agressiva. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 03 / 12 /2018

Banca Examinadora

Profa. Dra. Priscila Larcher Longo

Instituição: Centro Universitário das Américas Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin

Instituição: Universidade Estadual de Campinas Julgamento: Aprovada

Aos meus pais Zilda e Fernando, e meu irmão Jorge, por terem acreditado junto comigo nesse sonho que sempre me acompanhou. Vocês são essenciais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por sempre me guiar apenas para caminhos abençoados.

Agradeço à minha família, minha mãe **Zilda**, meu pai **Fernando** e meu irmão **Jorge Fernando**: por sempre acreditarem em meus sonhos e sonhá-los junto comigo. É a melhor tradução que posso fazer para contar o que vocês viveram comigo desde quando decidi ingressar na Universidade de São Paulo e posteriormente, no curso de mestrado. É o que fazemos em nossa família: apoiamos uns aos outros para que todos possam vencer juntos. Especialmente ao meu pai, que me incentivou a cursar Odontologia e sempre me inspirou pelo o ótimo profissional que é.

Agradeço também aos meus avós, **Ramiro** e **Eva**, minha avó **Otília** e tia **Madalena**, que sempre torceram por mim.

Agradeço aos meus amigos e colegas de graduação que também me apoiaram e acompanharam nessa jornada: **Cindi**, **Victor**, **Vania**, **Mirian**, **Ellen**, **Vinícius** , **Carol** e **Claudia**. À minha amiga de infância **Gabriela** e à minha prima, **Marina**.

Agradeço aos meus amigos e colegas da pós-graduação, com quem dividi momentos de “tensão” mas também de bastante felicidade: **Marcela Giudicissi** (pela amizade, apoio, compreensão – sua amizade foi um presente da pós-graduação), **Marília Cabral**, **Laís Nakao**, **Bruno França**, **Letícia Gasparoni**, **Emmanuel Albuquerque**, **Bruna Di Profio**, **Monica Misawa**, **Carlos Benitez**, **Emanuel Rovai**, **Maria Luísa**, **Carlos Rubio**, **Vanessa Marui**, **Marcelo Sirolli** e **Rodrigo Oliveira, Marcella Moro e Alexandre Llanos** . Vocês foram muito importantes para meu crescimento intelectual, profissional e pessoal.

Aos queridos professores da pós-graduação em Periodontia: Profa. Dra. **Marinella Holzhausen Caldeira**, Profa. Dra. **Cristina Cunha Villar**, Profa. Dra. **Márcia Pinto Alves Mayer**, Profa. Dra. **Marina Conde**, Prof. Dr. **João Batista Cesar Neto**, Prof. Dr. **Claudio Mendes Pannuti**, Prof. Dr. **Giorgio de Micheli**, Prof. Dr. **Marco**

Antonio Paupério Georgetti, Prof**. Dr. Luiz Lima** e Prof. Dr. **Giuseppe Alexandre Romito**, titular da Disciplina. Obrigada pelos ensinamentos e exemplos, tanto na graduação como na pós-graduação.

Ao laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas, aonde tive o prazer de iniciar minhas atividades científicas ainda como aluna de iniciação científica, em 2011. Obrigada à Profa. Dra. **Márcia Pinto Alves Mayer** pelas portas sempre abertas e fundamental cooperação em nossos estudos. **Ellen**, **Silvia**, **Dione**, **Pamela**, **Maike**, **Priscila**, **Marcela**, **João** e **Léo**: meus sinceros agradecimentos.

À secretária da Periodontia, **Marília**, quem socorre e ajuda a todos!

A todos os outros **funcionários e trabalhadores da FOUSP**, que contribuem para que o nosso dia-a-dia aconteça sem grandes transtornos.

Agradeço à minha **banca avaliadora**, a cada um de vocês que dispôs de um tempo tão precioso para contribuir com a minha formação. Obrigada.

Não posso deixar de agradecer especialmente à minha querida orientadora, Profa. Dra. **Luciana Saraiva**, com quem dividi muitas experiências desde quando era ainda caloura na Universidade. Gostaria de agradecer por todas as oportunidades até hoje. Todas me auxiliaram na evolução como pessoa, aluna e cada vez mais professora, me ajudando diariamente a construir um pensamento coerente com a vida acadêmica. Sempre nos observando e oferecendo possibilidades de crescimento... Só tenho a agradecer. Pela confiança, pela responsabilidade, pelo carinho, pela preocupação, por ser uma “mãe-científica” e amiga para mim.

Agradeço à **Biblioteca FOUSP** com seus funcionários sempre prontos a nos ajudar, especialmente à **Glauci Elaine Damásio Fidelis**, que gentilmente me recebeu para os últimos ajustes.

Agradeço também ao **Marcos Alípio**, do Xerox FOUSP, pela cooperação nos últimos momentos e impressão.

Aos funcionários da secretaria de Pós Graduação, **Carlos, Cátia e Alessandra**: muito obrigada pelas informações e suporte durante o curso.

Ao **Francisco Carlos Toro da Silva**, por me ajudar constantemente a enxergar minhas próprias ferramentas para uma vida melhor e positiva.

Ao **Enrico Kaigawa Fagnani**: Agora já encontro- me sem palavras para agradecer o apoio, a compreensão, os incentivos, o carinho, as conversas, sugestões, companheirismo e a torcida. Obrigada por me ajudar neste ano e estar ao meu lado nessa conquista!

Agradeço também às agências de fomento **CAPES** (PROCESSO:1698438) e **FAPESP** (PROCESSOS:2010/16162-1 e 2013/26381-0) pelo financiamento para pesquisas e pela bolsa concedida a mim, durante o tempo que dediquei ao mestrado.

Por fim, agradeço a todos os demais envolvidos, todos de muita importância em minha vida para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada.

“A conquista da liberdade é algo que faz tanta poeira, que por medo da bagunça, preferimos, normalmente, optar pela arrumação.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Rebeis ES. Determinação da resposta de imunoglobulina G sérica contra Omp29 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em pacientes portadores de periodontite agressiva [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida

A Periodontite Agressiva (PA), que atualmente pertence ao grupo das Periodontites estágios 3 e 4, distingue-se dos demais tipos de doença periodontal por seu início precoce, agregação familiar dos casos e por afetar pacientes sistemicamente saudáveis. Além disso, pode ser subclassificada em duas formas, localizada (PAL) e generalizada (PAG), em função de sua extensão. Muitas vezes, os depósitos de biofilme bacteriano são desproporcionais à quantidade de destruição óssea e perda de inserção que o paciente apresenta, independente da subclassificação. O microrganismo mais relacionado à etiopatogênese da doença é o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), incluindo os seus principais sorotipos a, b e c, amplamente estudados. Associado a estas condições, *A. actinomycetemcomitans* apresenta alguns fatores de virulência como uma leucotoxina, principalmente ligada ao sorotipo b - clone JP2 (que é altamente leucotóxico) e proteínas de membrana externa (OMPs), especialmente Omp29. A resposta de imunoglobulina G (IgG) sérica contra este patógeno foi anteriormente associada à ambas as formas de PA, porém, são escassos os estudos que avaliaram longitudinalmente a resposta sérica frente a variáveis como estas. Dessa maneira, o objetivo desse estudo foi avaliar a resposta sérica, de 27 pacientes com PA e 10 pacientes periodontalmente saudáveis, contra Omp29 e sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*, através de um ensaio ELISA, correlacionando com o número de cópias de JP2 (obtidos por qPCR em tempo real) e parâmetros clínicos, a partir de dados anteriormente coletados por nosso grupo. Todos os dados foram obtidos antes do início do tratamento e um ano após seu término. O tratamento consistiu de orientações de higiene bucal, tratamento mecânico e antibioticoterapia. Os dados resultantes do estudo mostraram que em ambas as formas de PA houve uma redução significativa na profundidade clínica de sondagem (PCS)($p<0,001$), nível clínico de inserção (NCI)($p<0,001$) e na resposta sérica contra Omp29 e

sorotipo c de *A. actinomycetemcomitans*(p>0,005). Após 1 ano, os valores de densidade óptica (D.O.) normalizados para Omp29 e sorotipos de *A. actinomycetemcomitans,* bem como o número de cópias do clone JP2 tornaram-se similares aos níveis encontrados nos controles. A redução no número de cópias do clone JP2 foi correlacionada com redução da PCS em PAL(r=0.80,p=0.0042) e valores de D.O. normalizados de Omp29 em PAG(r=0.66,p=0.005). O estudo concluiu que o tratamento periodontal foi eficaz em alterar a resposta sérica contra Omp29 e sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*, além de reduzir o número de cópias do clone JP2 e melhorar os parâmetros clínicos.

Palavras-chave**:** Sorotipos. Proteína de membrana externa -29 kDa. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Periodontite agressiva.

ABSTRACT

Rebeis ES. Determination of serum immunoglobulin G response against Omp29 of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with aggressive periodontitis [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Aggressive Periodontitis (AP), which currently belongs to the group of Periodontites stages 3 and 4, is distinguished from other types of periodontal disease due to its early onset, familial aggregation of cases and to affect systemically healthy patients. In addition, it can be sub classified into two forms, localized (PAL) and generalized (PAG), depending on its extent. Often, bacterial biofilm deposits are disproportionate to the amount of bone destruction and loss of insertion that the patient presents, regardless of sub classification. The most important microorganism related to the etiopathogenesis of the disease is *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), including its main serotypes a, b and c, widely studied. Associated with these conditions, *A. actinomycetemcomitans* presents some virulence factors such as leukotoxin, mainly linked to serotype b - clone JP2 (which is highly leukotoxic) and outer membrane proteins (Omp's), especially Omp29. Serum immunoglobulin G (IgG) response against this pathogen was previously associated with both forms of BP; however, there are few studies that longitudinally evaluated the serum response to variables such as these. Thus, the objective of this study was to evaluate the serum response of 27 patients with AP and 10 periodontally healthy patients against Omp29 and *A. actinomycetemcomitans* serotypes by an ELISA, correlating with the number of copies of JP2 (obtained by qPCR in real time) and clinical parameters, from data previously collected by our group. All data were obtained prior to initiation of treatment and one year after its completion. The treatment consisted of oral hygiene guidelines, mechanical treatment and antibiotic therapy. Data from the study showed that in both forms of BP there was a significant reduction in clinical depth of sampling (PCS) ($p<0,001$),, clinical level of insertion (NCI)($p<0,001$) and serum response against Omp29 and serotype c of *A. actinomycetemcomitans*($p>0,005$). After 1 year, normalized optical density (O.D.) values for Omp29 and *A. actinomycetemcomitans* serotypes, as well as the number

of copies of clone JP2 became similar to the levels found in the controls. The reduction in copy number of clone JP2 was correlated with reduction of PCS in PAL(r=0.80,p=0.0042) and O.D. normalized from Omp29 to PAG(r=0.66,p=0.005). The study concluded that periodontal treatment was effective in altering the serum response against Omp29 and *A. actinomycetemcomitans* serotypes, in addition to reducing the number of copies of clone JP2 and improving clinical parameters.

Keywords: Serogroup. 29- kDa outer membrane protein. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Aggressive Periodontitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1 - Parâmetros clínicos de PAL e PAG no início e após um ano de acompanhamento 51

Figura 5.2 - Razão entre o número de bolsas que inicialmente apresentavam PCS>6 mm e o número de bolsas que após tratamento não cirúrgico e 1 ano de acompanhamento, apresentavam PCS<4 mm..... 52

Figura 5.3 - Médias dos valores de D.O. indicando níveis de IgG sérica (1:10.000 para sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* e 1:10 para Omp29) de PAL, PAG e indivíduos saudáveis determinados por ELISA, utilizando células inteiras de *A. actinomycetemcomitans* sorotipo a (ATCC 29523), sorotipo b (clone JP2) e sorotipo c (AS 1151) e Omp29, como antígenos 53

Figura 5.4 - Níveis subgengivais de *A. actinomycetemcomitans* total e clone JP2 inicialmente e após um ano de acompanhamento do tratamento periodontal em pacientes com PAL, PAG e controles saudáveis..... 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Periodontia
Bp	Par de bases
CDT	Toxina Distensora Citoletal
CO_2	Dióxido de Carbono
D.O.	Densidade Óptica
H_2	Hidrogênio
G	Gramas
IgG	Imunoglobulina G
IL-1β	Interleucina 1- Beta
LPS	Lipopolissacarídeo
Ltx	Leucotoxina
µl	Microlitros
µg	Microgramas
mg	Miligramas
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
M	Molar
Nm	Nanômetros
NCI	Nível Clínico de Inserção
N_2	Nitrogênio
Omp	Proteína de Membrana Externa
Omp29	Proteína de Membrana Externa 29

PA	Periodontite Agressiva
PAL	Periodontite Agressiva Localizada
PAG	Periodontite Agressiva Generalizada
PC	Periodontite Crônica
PGE_2	Prostaglandina E_2
PCS	Profundidade Clínica de Sondagem
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossômico
RG	Recessão Gengival
SS	Sangramento à Sondagem

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
<	Menor
<	Maior
±	aproximadamente
§	Utilizado para sinalizar diferença significante
$	Utilizado para sinalizar diferença significante
*	Utilizado para sinalizar diferença significante
€	Utilizado para sinalizar os valores de D.O. acima dos níveis de corte
Δ	Variação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25
2 REVISÃO DE LITERATURA 27
3 PROPOSIÇÃO 37
4 MATERIAL E MÉTODOS 39
4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO 39
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO 39
4.2.1 Critérios de inclusão 39
4.2.2 Critérios de exclusão 40
4.3 MENSURAÇÕES CLÍNICAS 41
4.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTO PERIODONTAL 42
4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 43
4.5.1 Análise da presença do clone JP2 e parâmetros clínicos e Omp29 43
4.6 ANÁLISES DE IgG SÉRICA CONTRA OMP29 44
4.7 ANÁLISES DE IgG SÉRICA CONTRA SOROTIPOS DE *A. actinomycetemcomitans* 46
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 47
5 RESULTADOS 49
5.1 AMOSTRA ANALISADA 49
5.2 TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICO 50
5.3 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO 56
6 DISCUSSÃO 57
7 CONCLUSÕES 63
REFERÊNCIAS 65
APÊNDICE A 77
ANEXO A 81

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Workshop para Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares de 2017, a Periodontite Agressiva (PA), atualmente é denominada Periodontite estágio 3 ou 4, dependendo da severidade, padrão inciso-molar, grau C (Caton et al., 2018). Foi durante muitos anos diferenciada dos demais tipos de periodontite por suas características específicas como: rápida destruição tecidual, localização das lesões e agregação familiar dos casos. Além disso, era subdivida em duas formas de manifestação: Periodontite Agressiva Localizada (PAL) que normalmente acomete os primeiros molares e incisivos e permanentes e a Periodontite Agressiva Generalizada (PAG) que envolve os mesmos grupos dentários, porém abrangendo pelo menos mais três dentes permanentes. Suas características microbiológicas e imunológicas também começaram a ser estudadas frente a estas diferenças clínicas (Tonetti; Mombelli, 1999; Albandar, 2014; Fine et al., 2018).

Quanto à microbiota, o patógeno mais associado a este quadro, principalmente na PAL, é o *Aggragatibacter actinomycetemcomitans (A. actinomycetemcomitans)* (Slots et al., 1980; Zambon et al., 1983; Gafan et al., 2004; Cortelli et al., 2005; Da Silva-Boghossian et al., 2011; Fine et al., 2018). Porém, além de estar associado à doença, *A. actinomycetemcomitans* também pode ser encontrado em periodontos saudáveis (Faveri et al*.,* 2009).

Consequentemente, para estar associado à doença, o patógeno depende de seus fatores de virulência e da susceptibilidade do hospedeiro (Fine et al*.,* 2005). Assim, *A. actinomycetemcomitans*, uma vez que preenche estes critérios nos pacientes com doença periodontal, pode manifestar os seguintes fatores: presença de leucotoxina, toxina distensora citoletal (CDT), adesinas, fímbrias, lipopolissacárides (LPS) e proteínas externas de membrana (OMPs), presentes também na membrana externa de outras bactérias Gram-negativas (Wilson; Hamilton, 1995). Esses fatores de virulência promovem adesão a superfícies orais podendo suprimir ou inativar o sistema imunológico do hospedeiro, resultando em inflamação e danos teciduais (Umeda et al., 2013).

Uma dessas proteínas é conhecida como Omp29 e já foi verificado que ela facilita a evasão da resposta do hospedeiro frente ao *A. actinomycetemcomitans*,

além de facilitar a entrada desta bactéria em células epiteliais gengivais (Kajiya et al., 2011).

Clinicamente, o tratamento da PA é desafiador, uma vez que os pacientes apresentam destruição acentuada com alta taxa de progressão. Atualmente, o protocolo de tratamento consiste em orientação de higiene bucal, raspagem e aplainamento radicular e prescrição de antibioticoterapia sistêmica. Esta última ferramenta vem cada vez mais sendo testada quanto à posologia e momento adequado para a administração dos medicamentos, ao ser associada à terapia mecânica (Feres et al., 2018)

Até o presente momento, pouco se conhece sobre as funções da Omp29 e, desse modo, os objetivos desse estudo foram verificar a resposta de anticorpos contra Omp29 em sujeitos portadores de periodontite agressiva, se houve alterações nessa resposta decorrentes do tratamento periodontal, e tentar entender um pouco mais sobre o papel desta proteína e qual a sua relação com a PA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A Periodontite Agressiva (PA), já recebeu outras nomenclaturas. O termo "periodontose" descrevia uma doença periodontal severa em indivíduos adultos (Gottlieb, 1923; Orban; Weinmann, 1942). A Academia Americana de Periodontia, em 1950, definiu periodontose como “a destruição degenerativa não inflamatória do periodonto, caracterizada pela migração e perda dentária na presença ou ausência de proliferação epitelial secundária e formação de bolsa ou doença gengival secundária”.

Os termos "periodontite juvenil" e "periodontite de início precoce" foram introduzidos por Butler em 1969 e pela AAP em 1989 e foram amplamente utilizados durante as últimas três décadas do século 20. Em 1999, no Workshop de Classificação da Academia Americana de Periodontia (Armitage, 1999), foi adotada a terminologia "Periodontite Agressiva”, vigente até os dias atuais (Albandar, 2014). Em 2017 um consenso realizado entre membros da Academia Americana de Periodontologia e da Federação Europeia de Periodontia propôs uma nova classificação para as doenças periodontais e periimplantares. Surgiu então uma nova denominação para essa doença, publicada em julho de 2018, que descreve a doença como Periodontite, enquadrada entre os estágios 3 ou 4, dependendo da severidade da condição periodontal, com padrão inciso-molar e grau C, em função da rápida taxa de progressão (Caton et al., 2018).

Apesar dessa nova classificação, esse tipo de doença periodontal distingue-se das demais pela rápida progressão, manifestações clínicas de início precoce, história médica não significativa e agregação familiar dos casos (Lang et al*.,* 1999). Fatores sistêmicos e locais, como tabagismo e diabetes foram propostos como modificadores que poderiam mascarar a acurácia do diagnóstico (Armitage, 2010). Algumas características consideradas secundárias, por não serem universais, podem estar presentes nas manifestações da doença: quantidade de depósitos microbianos inconsistentes com a severidade da destruição periodontal, proporções elevadas de *A. actinomycetemcomitans* e, em algumas populações, de *P. gingivalis*, anormalidades fagocitárias, fenótipo hiper-responsivo dos macrófagos, incluindo produção elevada de prostaglandina E_2 (PGE_2) e interleucina 1-β (IL-1β) em resposta às endotoxinas bacterianas (Lang et al*.,* 1999).

Além destas características, a periodontite agressiva pode ser classificada como localizada ou generalizada.

Segundo Lang et al. (1999) e Tonetti e Mombelli (1999), a PAL tem início circumpuberal, apresenta-se localizada em primeiros molares e incisivos com perda óssea e de inserção em pelo menos dois dentes permanentes, sendo um deles o primeiro molar, e envolvendo não mais que dois outros dentes além de primeiros molares e incisivos. Além disso, pode apresentar robusta resposta sérica aos agentes infecciosos. Já a PAG geralmente afeta pessoas com menos de 30 anos de idade, mas pode acometer sujeitos com idades superiores. Os indivíduos apresentam perda óssea e de inserção interproximal afetando pelo menos três dentes permanentes além dos primeiros molares e incisivos, exibem episódios pronunciados de destruição tecidual e pobre resposta sérica aos agentes infecciosos.

Susin et al. (2014) mostraram que os estudos epidemiológicos sobre periodontite agressiva possuem diferentes desenhos e protocolos tanto para exame quanto para classificação, o que dificulta o estabelecimento da prevalência desses casos. O estudo deles mostra também que a prevalência de periodontite agressiva varia significativamente entre as diferentes regiões geográficas e entre diferentes etnias. Além disso, a periodontite agressiva tem alta prevalência nas populações africanas e em seus descendentes. Países da América do Sul compreendem uma composição étnica diversificada. Chile e Argentina compondo a maioria da população caucasiana e o restante dos países, com uma maior miscigenação dos povos. A prevalência de periodontite agressiva na América do Sul varia entre 0,3% e 2,0%, dependendo da composição populacional.

Quanto ao aspecto microbiológico, *A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, T. forsythia e T. denticola* são considerados periodontopatógenos e podem estar relacionados à periodontite agressiva, além de estarem presentes em outras formas de doença periodontal (Zambon et al. 1983; Albandar et al., 1997; Tinoco et al., 1997; Socransky et al., 1998).

Dentre todos os supostos patógenos periodontais, *A. actinomycetemcomitans* sem dúvida foi o mais relacionado à PA, especificamente à sua forma localizada (Meyer; Fives-Taylor, 1997; Zambon, 1985, Tsai et al., 2018; Fine et al., 2018). Ele também pode ser encontrado em pacientes com periodontite crônica e em pacientes periodontalmente saudáveis (Slots et al., 1999 Porém, atualmente é sabido que não

se pode considerar este patógeno como único responsável pela instalação da doença.

A inflamação descontrolada do periodonto pode surgir quando comunidades do complexo microbiano deixam de ser comensais e tornam-se patogênicas. Assim, a comunicação entre espécies constituintes conduzem a uma sinergia polimicrobiana metabolicamente compatível com os organismos que especializam suas funções dentro da comunidade. Patógenos “pedra-angulares”, como podemos considerar o *A. actinomycetemcomitans* na PA, alteram o microambiente, modulam a resposta do hospedeiro induzindo perda da homeostase, e permitindo a disbiose microbiana, com o objetivo de atenuar a resposta imunológica, enquanto uma resposta inflamatória exacerbada é promovida. (Hajishengallis ; Lamont, 2012)

Na PA, existe uma disbiose da microbiota subgengival que reflete baixa proporção de microrganismos benéficos e uma associação de *A. actinomyectemcomitans* e outros patógenos potencialmente virulentos, resultando em inflamação exacerbada que leva à perda óssea. (Faveri et al, 2009 ; Van Esscher et al, 2013 ; Silva MP , 2016)

A. actinomycetemcomitans, descrito pela primeira vez em 1912, é um membro da família *Pasteurellaceae* e pode ser responsável por infecções não orais incluindo endocardites infecciosas, bacteremias, pericardites, septicemias, pneumonias, artrite infecciosa, osteomielites, sinovites, infecções de pele, infecções no trato urinário e abscessos (Henderson et al., 2003; Van Winkelhoff et al., 1999). Faz parte do importante grupo bacteriano conhecido como HACEK, formado por *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus aphrophilus*, *A. actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e *Kingella kingae*. Neste grupo estão reunidos microrganismos que produzem, com frequência, situações infecciosas similares. São bactérias Gram-negativas, colonizadoras da cavidade oral, de crescimento lento, porém, acelerado na presença de dióxido de carbono, embora não tenham relação filogenética. Estas bactérias causam cerca de 3% dos casos de endocardite infecciosa e entre elas, *A. actinomycetemcomitans* é o patógeno mais envolvido nesta condição (Henderson et al., 2003; Paturel et al., 2004).

Por muitos anos foi chamado de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, mas Nørskov-Lauritsen e Kilian (2006) reclassificaram-no como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. É considerado um coco-bacilo Gram-negativo imóvel, capnofílico e anaeróbio facultativo. Análises sorológicas e genômicas auxiliaram na

identificação de sete sorotipos de *A. actinomycetemcomitans,* (a-g), classificados de acordo com seu polissacarídeo de superfície, podendo ser relacionados à saúde ou à doença, dependendo da população e da resposta do hospedeiro (Kaplan et al., 2002; Umeda et al., 2013).

De acordo com a literatura, os sorotipos predominantes de *A. actinomycetemcomitans* são: a, b e c (Zambon et al., 1983; Chung et al., 1989; Asikainen et al., 1991; Haubek et al., 1997; Tinoco et al., 1997; Dogan et al.,1999; Mombelli et al.,1999; Saarela et al.,1999; Kaplan et al., 2001). Deve-se ressaltar a maior quantidade de estudos apenas com estes três sorotipos, Já que são os mais prevalentes.

A frequência de distribuição dos sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* difere entre as populações. Nos Estados Unidos, o sorotipo b é detectado com mais frequência que os sorotipos a e c, nos pacientes com PAL (Zambon et al., 1983). Na Finlândia, o sorotipo b é predominante em pacientes com PA e o sorotipo c é mais comum em pacientes com saúde periodontal (Asikainen et al.,1991) Em indivíduos japoneses com periodontite, os sorotipos a, c e são os mais predominantes (Yamamoto et al.,1997). Deste modo, pode-se inferir que virulência e patogenicidade de cada sorotipo variam de acordo com a população (Suzuki et al.,2006)

No Brasil, em um estudo realizado por Teixeira et al. (2006), os dados encontrados divergiram dos anteriormente reportados; os autores encontraram uma associação entre cepas do sorotipo b e saúde periodontal e, entre cepas do sorotipo c e periodontite crônica. Saraiva et al. (2014) em um estudo em que os dados confirmaram alta resposta de anticorpos contra *A. actinomycetemcomitans* em pacientes com PA, relataram que as respostas frente aos sorotipos b e c estavam mais associadas à PA, independentemente da extensão e da destruição.

Alguns estudos populacionais avaliaram a presença do *A. actinomycetemcomitans* e as evidências mostraram que o sorotipo a, na maioria dos casos, está associado à saúde periodontal. O sorotipo b está mais relacionado à doença, muito provavelmente devido à existência de uma cepa altamente leucotóxica - clone JP2 (Haubek et al., 2014) e, o sorotipo c depende muitas vezes da localidade geográfica e etnia, como reportado por Teixeira et al.(2006)e Saraiva et al. (2014).

Existe uma linhagem particular entre as cepas do sorotipo b que produz altos níveis de leucotoxina (ltx), e que está muito associada à PAL em africanos. Esta

cepa, representada especificamente pelo clone JP2, foi detectada na metade da década de 90. Os estudos mostram que este clone é endemicamente presente no noroeste africano e parece ter um papel de destaque no início da perda de inserção periodontal na população jovem com periodontite desta região, comparado aos seus pares não-JP2 (Haubek; Johansson, 2014). O mapeamento deste clone de *A. actinomycetemcomitans* em pacientes com periodontite revelou que sua colonização é restrita a afro-descendentes, mas ainda é incerta a maneira pela qual esta cepa se difundiu da África para os demais países.

Mutações características permitiram que o clone JP2 de *A. actinomycetemcomitans* fosse isolado tanto da região mediterrânea quanto no leste africano. Os resultados de um estudo de Haubek et al. (2007) sugeriram que as cepas inicialmente emergiam como um genótipo distinto na parte mediterrânea da África e subsequentemente difundiram-se para o leste e, de lá, foram transferidas ao continente americano durante o tráfico de escravos pelo oceano Atlântico (Haubek et al., 2007).

Os indivíduos com colonização por JP2 parecem ter maior risco ao desenvolvimento da PA, principalmente para o desenvolvimento da PAL (Haubek et al., 2008). Sua principal característica é a expressão de altos níveis da leucotoxina, importante fator de virulência que induz apoptose não apenas em neutrófilos e macrófagos humanos mas também em células endoteliais (Fine et al., 2007; Dietmann et al., 2013). Sabe-se também que a transmissão desse clone já foi anteriormente demonstrada em diversos estudos e, que ele pode ser transmitido através de contato próximo e, entre famílias (Haubek et al., 2008).

Em 1979 foi a primeira vez que um Gram-negativo anaeróbio, *Actinobacillus* Y4 foi isolado a partir da placa bacteriana de paciente com periodontite juvenil . Assim, após a descoberta que extratos de *A. actinomycetemcomitans* causavam morte de leucócitos (Baehni et al.,1979; Tsai et al.,1979), a leucotoxina (LtxA) foi identificada como a molécula responsável pelos efeitos deletérios descritos, que eram restritos aos leucócitos polimorfonucleares e monócitos (Haubek et al., 2008).

Mais tarde foi mostrado que essa leucotoxina, LtxA, pode afetar também linfócitos, eritrócitos, células endoteliais humanas e células de origem animal. Porém, são necessárias altas concentrações de LtxA para que ocorra lise dessas células.. A leucotoxina interage com diferentes células do hospedeiro por uma

variedade de vias que ativam mecanismos celulares e moleculares, alguns deles, associados à patogênese da periodontite.

Apesar das evidências existentes ao redor do clone JP2 de *A. actinomycetemcomitans*, a presença de baixa produção de leucotoxina em sujeitos com PA sugere que outros fatores de virulência possam estar envolvidos na patogênese dessa doença (Pinheiro et al., 2011).

Assim, a Toxina Distensora Citoletal (CDT), outro característico fator de virulência do *A. actinomycetemcomitans*, atinge uma variedade de células, incluindo células do sistema imunológico, e modula a resposta imune pela indução de apoptose de células monocíticas não proliferativas e linfócitos T (Ando et al.,2010; Fernandes et al., 2008; Rabin et al., 2009). Além destes fatores, foram relatados, em análises imunológicas de pacientes colonizados por *A. actinomycetemcomitans,* que estes indivíduos frequentemente exibem marcadores de resposta humoral a constituintes expostos na membrana externa desse microrganismo, incluindo os lipopolissacárides (LPS) e as proteínas externas de membrana, as Omps (Bolstad et al., 1990; Watanabe et al., 1989).

Bactérias Gram-negativas, são caracterizadas pela presença de uma dupla membrana: a membrana citoplasmática ou membrana interna, e a camada bilipídica e assimétrica, a membrana externa, que abriga fosfolipídios e LPS em suas duas faces. *Escherichia coli* pode ser considerada como um bom sistema modelo para simulação de detalhes moleculares a respeito das OMPs.

Como dito anteriormente, as OMPs têm sido identificadas em muitas bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Haemophilus influenzae* tipo b e *Haemophylus ducreyi* (Komatsuzawa et al., 1999). Algumas delas são identificadas como porinas, receptores de ferro e também como fatores de virulência incluindo adesinas, invasinas e fatores envolvidos na resistência à opsonização e morte (Komatzusawa et al., 2002)

Bolstad et al. (1990) mostraram a existência de Omps em *A. actinomycetemcomitans* mas não relataram suas funções. Esta proteína é considerada termo modificável (DiRienzo et al.,1983) e após ser purificada, foi identificada como representante do maior alvo de IgG no soro de pacientes com PAL (Wilson,1991)

Wilson (1991) realizou um estudo para determinar se a principal Omp de *A. actinomycetemcomitans* era estruturalmente relacionada às proteínas OmpA das

demais espécies de bactérias Gram-negativas. Baseado na comparação da sequência N- terminal da Omp encontrada em *A. actinomycetemcomitans*, foi feita a comparação com as demais Omps de bactérias Gram-negativas e foi apresentada homologia estrutural e imunológica. Assim, podemos considerar as características da OmpA como modelo para Omp29, quanto à características ainda não tão bem elucidadas.(Silva MP, 2016)

As Omp´s estão presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas e são produzidas no citoplasma. Assim, são translocadas através da membrana interna e, provavelmente, difundidas pelo periplasma antes de sua inserção na membrana externa. A passagem pelo periplasma promove mudanças na conformação da proteína que facilitam a sua inserção na membrana externa, devido à sua natureza hidrofóbica.(Mogensen; Otze, 2005) As Omp´s integrais invariavelmente compreendem um número par de filamentos antiparalelos e anfipáticos, que se dobram em cilindros dos quais os resíduos hidrofóbicos apontam para fora.(Silva MP, 2016)

As Omp´s exercem papel central na manutenção da estrutura da membrana (Kleinshmidt, 2006) e na formação de porina permeável a íons, o que é possível pelo mecanismo de entrada eletrostática influenciada por sal, que permite a sobrevivência bacteriana durante o estresse osmótico (Honget, 2006).

Sabe-se que a Omp29 se liga à porção Fc da imunoglobulina, que pode inibir a ativação do sistema complemento no hospedeiro. (Mintz; Fives Taylor, 1994). A proteína também está associada com a entrada de *A. actinomycetemcomitans* em células epiteliais gengivais devido ao aumento da regulação do rearranjo da actina F por meio da via de sinalização FAK (Kajiya et al,2011).

Em alguma situações a expressão da Omp pode ser influenciada pelo ambiente externo. Seu aumento pode estar associado à cultura anaeróbica e a diminuição, ao desafio ácido e exposição a peptídeos antimicrobianos (Smith et al, 2007a).Enfatizando esses dados, Longo et al, 2008 observaram uma regulação da expressão de virulência por condições ambientais, já que a expressão do gene Omp29 depende da fase de cultura bacteriana.

As proteínas da família Omp A aparecem altamente conservadas ao longo da evolução e tem demonstrado servir com receptor para bacteriófagos (Datta et al., 1977; Van Alphen et al., 1977), para conjugação (Schweizer et al., 1977; Van Alphen et al., 1977) e para conferir estabilidade à membrana externa (Sonntag et al., 1978).

A presença de bacteriófagos capazes de infectar *A. actinomycetemcomitans* foi associada às lesões periodontais, as quais são relacionadas com doença em crianças com PAL e adultos jovens com manifestações de PA. Já foram identificadas seis Omps, designadas de acordo com suas massas moleculares. São elas: Omp100, Omp64, Omp39, Omp29, Omp18 e Omp16 (Komatsuzawa et al., 1999). A Omp100, com maior massa molecular, possui homologia com uma variedade de fatores de virulência, como adesão, invasão e resistência sérica (Asakawa et al., 2003).

Estudos demonstraram que a Omp29 reage fortemente ao soro de pacientes com PA (Wilson, 1991; Wilson; Hamilton, 1995) e estes achados sugerem o envolvimento da Omp29 na doença. Além disso, a Omp29 quando aquecida, devido à sua característica termo-modificável, é denominada Omp34. (Komatsuzawa et al., 2002)

Essas proteínas são essenciais para manter a integridade e permeabilidade seletiva das membranas bacterianas. Além disso, também desempenham um importante papel na patogênese bacteriana melhorando a adaptação dos patógenos bacterianos em diversos ambientes (Lin et al., 2002) através da invasão mas não na aderência de células epiteliais (Kajiya et al., 2011). Além disso, dados de Longo et al. (2013) indicam que sistemas regulatórios diferentes estão envolvidos na expressão de Omp29 e Omp100, sugerindo que essas proteínas possam participar em diferentes estágios da infecção por *A. Actinomycetemcomitans.*

Lin et al. (2002) verificaram o envolvimento das OMPs na adaptação bacteriana em condições de infecção do hospedeiro, na carência nutricional (limitação de ferro), na presença de peptídeos antimicrobianos (APM´s) no sistema circulatório e superfícies mucosas, na atividade bacteriana e complementos, nos tratamentos antibióticos e na presença de detergente semelhante à bile no intestino.

No que diz respeito à resistência ao peptídeo antimicrobiano, ocorre a degradação direta desses peptídeos através da produção de membranas externas associadas a proteases e à modificação da superfície bacteriana, através da produção de Omps com atividade enzimática.

Considerando a resistência sérica como um determinante patogênico, uma vez que as bactérias Gram-negativas entram na corrente sanguínea, ocorre infecção, facilitando a evasão dos mecanismos de defesa da imunidade inata (sistema complemento e peptídeo antimicrobiano). Assim, as bactérias evadem das

ações provocadas pelo sistema complemento por diferentes modos, por exemplo: produção de cápsulas de polissacarídeos extracelulares protetores e pela produção de fatores que inibem ou interferem na cascata do complemento, pela inibição da via clássica ,da via das lectinas e da via alternativa, inibindo C4b e/ou fator H. (Lindhol et al., 2018)

Desse modo, as Omps têm importante papel na instalação e estabilidade de *A. actinomycetemcomitans* no hospedeiro. Em um estudo de Kishimoto et al. (2008) foi visto que a exposição de células epiteliais gengivais à Omp29 de *A. actinomycetemcomitans* ou à célula total de *A. actinomycetemcomitans*, causa aumento na secreção de IL-8 e inibição de junções intercelulares, levantando a possibilidade de que a Omp29 aumenta os níveis de IL-8 em células epiteliais gengivais humanas. Devido à natureza pró-inflamatória de Il-8, seus níveis aumentados contribuem para progressão da inflamação e estabelecimento do patógeno.

Umeda et al. (2013) observaram que Omp29 foi transcrita em níveis muito baixos para as cepas dos sorotipos a e c de *A. actinomycetemcomitans*, quando comparada ao clone JP2 (cepa do sorotipo b). Além disso, a baixa expressão de Omp29 para o sorotipo a, pode indicar o reconhecimento pelo hospedeiro e o processo inflamatório resultante, explicando a associação deste sorotipo com a saúde. Os dados deste estudo sugerem que a regulação dos genes de virulência em *A.actinomycetemcomitans* pode ser considerada específica para cada cepa e contribui com o entendimento da ampla associação, por exemplo, do sorotipo a, com saúde periodontal (Umeda et al*.,* 2013).

Clinicamente, o tratamento periodontal para pacientes com PA e seus objetivos não diferem notavelmente do tratamento realizado para pacientes com periodontite crônica(PC). No entanto, as consideráveis perdas óssea e de inserção periodontal, associadas à alta taxa de progressão, requerem um plano de tratamento bem elaborado e uma abordagem, muitas vezes, mais severa visando deter a destruição periodontal acentuada, bem como à estabilização da doença. Desse modo, este tratamento desafiador consiste em raspagem e aplainamento radicular, que em muitos casos, não é suficiente para o controle da PA (Teughels et al,2014). Frente a esta dificuldade, o protocolo de tratamento vem cada vez mais sendo explorado, associando à RAR, o uso de antibioticoterapia sistêmica, como o uso de Amoxicilina e Metronidazol, em diferentes posologias (Tinoco et al,1998; Cortelli et

al, 2005; Haas et al, 2008; Casarin et al, 2012; Feres et al, 2015). A literatura mostra até o presente momento, que a associação Amoxicilina(500mg) associada a Metronidazol (400mg) como coadjuvante, no início do tratamento periodontal, tem sido o método mais eficaz no controle da infecção. Considerando a similaridade quando ao tratamento para ambas as formas de periodontite, o protocolo mencionado tem sido utilizado também para o tratamento de pacientes com PA (Feres et al,2018).

Com base nas evidências apresentadas, para melhor elucidar o papel das OMPs, mais especificamente, Omp29, este estudo teve como objetivo determinar a resposta sérica contra Omp29 e sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* em pacientes com PA, previamente ao tratamento periodontal e um ano após seu término. Assim, procuramos relacionar estes dados com os parâmetros clínicos obtidos antes e após o tratamento periodontal e se presentes, com os sorotipos a, b e c de *A. actinomycetemcomitans*.

3 PROPOSIÇÃO

- Determinar os níveis séricos de IgG contra Omp29 de *A. actinomycetemcomitans* antes do tratamento e um ano após seu término.

- Correlacionar os níveis séricos da Omp29 com os parâmetros clínicos, com os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* e com a contagem do clone JP2, em pacientes portadores de PA, inicialmente e um ano após o término do tratamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Os participantes do estudo foram recrutados do Projeto Cappa (Clínica de atendimento a portadores de periodontite agressiva), coordenado pela Profa. Dra. Luciana Saraiva, entre os seguintes meses: agosto de 2010 e setembro de 2011.

Todos os sujeitos foram informados sobre a natureza de sua condição periodontal, riscos e benefícios de participarem do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Este estudo prospectivo foi conduzido de acordo com a declaração de Helsinki (de 1975, revisada em 2000) e com a resolução 466 do CNS(publicada em junho de 2013) este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP 155/2010, FOUSP 350.853/2013, FOUSP 2.340.501/2017).

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

4.2.1 Critérios de inclusão

- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido
- Ser portador de periodontite agressiva (AAP):

  * Localizada: como perda de inserção interproximal (>4mm) em pelo menos dois dentes permanentes, sendo um destes o primeiro molar e, envolvendo não mais que dois dentes além de primeiros molares e incisivos

  * Generalizada: como perda interproximal generalizada (>4mm) afetando pelo menos três dentes além dos primeiros molares e incisivos.
- -Participantes de ambos os gêneros com idade entre 18 e 38 anos
- Boa saúde geral

4.2.2 Critérios de exclusão:

- Presença de qualquer condição sistêmica que pudesse afetar a progressão da doença periodontal (como diabetes) ou que necessitasse de cobertura antibiótica para a terapia rotineira dental.
- Gestantes ou lactantes
- Não ter feito uso de antibióticos nos três meses prévios ao início do estudo.
- Ser tabagista

Os participantes (N=27), sendo 17 pacientes com PAG e 10 pacientes com PAL, foram classificados de acordo com os critérios clínicos sugeridos no Workshop para Classificação das Doenças e Condições Periodontais de 1999 (Armitage, 1999). Além disso, as perdas ósseas destes pacientes foram verificadas por meio de radiografias periapicais e a agregação familiar deveria ser confirmada em pelo menos um membro da família do indivíduo (avós, pais ou irmãos), com histórico de periodontite.

Dez pacientes periodontalmente saudáveis foram recrutados como controles, também provenientes da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, segundo os seguintes critérios:

1. Ausência de sítios com profundidade clínica de sondagem (PCS) e nível clínico de inserção (NCI) >3mm;
2. Sangramento à sondagem (SS) <10%;
3. ausência de lesões de cáries ou restaurações extensas;
4. Pelo menos 28 dentes permanentes presentes na boca.

Os critérios de exclusão, para o grupo controle, foram os seguintes:

1.Ter realizado terapia periodontal subgengival ou tratamento com antibioticoterapia nos seis meses anteriores ao estudo;
2. Possuir doenças sistêmicas que possam afetar a progressão da periodontite
3. Ser gestante ou lactante;
4. Ser tabagista.

4.3 MENSURAÇÕES CLÍNICAS

Nos dois momentos de avaliação, inicialmente e após um ano, foram mensurados os seguintes parâmetros clínicos:

- Sangramento à sondagem (SS) - determinado com base na presença ou ausência de sangramento até 30 segundos após a sondagem;
- Profundidade clínica de sondagem (PCS) - medida como a distância (em milímetros) da gengiva marginal livre até o fundo da bolsa periodontal;
- Recessão gengival (RG) - mensurada como a distância entre a junção esmalte–cemento e a gengiva marginal livre;
- Perda de inserção clínica (NCI) foi calculada pela soma da PCS e a RG.

Todos os parâmetros foram mensurados com a sonda Carolina do Norte (Hu-Friedy®, Chicago, EUA) em seis sítios por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-palatino/lingual, palatino/lingual e disto-palatino/lingual), exceto nos terceiros molares.

De acordo com os parâmetros obtidos no exame periodontal dos pacientes, foram geradas as médias tanto dos sítios afetados (NCI > 4 mm) quanto dos sítios

profundos (PCS > 6mm) para os parâmetros clínicos PCS e NCI. A reprodutibilidade das medidas foi calculada pelo coeficiente de correlação intra-classe para PCS (CIC=0,86) e NCI (CIC=0,85), em dois exames separados.

4.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTO PERIODONTAL

Conforme os pacientes foram incluídos no estudo, foram submetidos a uma série de visitas principais, com intervalo de 1 semana(7 dias) entre elas:

- Visita 1 - Preenchimento da ficha de anamnese , preenchimento do TCLE, coletas de sangue, de biolfime subgengival e fluido gengival;
- Visita 2 - Exame clínico periodontal completo, raspagem supragengival com ultrassom, orientações para higiene bucal (uso do fio dental, uso da escova dental e outros dispositivos de higiene, quando necessário);
- Visitas 3 a 7 - Raspagem subgengival sob anestesia, dividida em quadrantes e reforço das instruções de higiene bucal;
- Visita 8 - Revisão dos procedimentos realizados. Os sujeitos entravam em uma pausa para a cicatrização dos tecidos e posterior reavaliação;
- Visita 9 - Reavaliação periodontal, quando novo exame clínico periodontal completo era feito, havia prescrição de antibióticos, reforço das técnicas de higiene bucal e controle periodontal (raspagem com ultrassom, complementação com curetas manuais e polimento coronário com pedra-pomes).
- A partir da visita 10 - controles periodontais trimestrais.

O protocolo utilizado em todos os participantes, no momento da reavaliação, foi: Amoxicilina 500 mg (1 cápsula a cada 8 horas, durante 7 dias) e Metronidazol 400 mg (1 comprimido a cada 8 horas, durante 7 dias)(Herrera et al. ,2002) Os pacientes foram orientados a ingerir os dois medicamentos juntos, no mesmo horário e também foram orientados quanto aos possíveis efeitos adversos.

4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Todas as coletas foram realizadas e armazenadas, e posteriormente, foram feitas as análises de acordo com cada experimento.

4.5.1 Análise do clone JP2 presente com parâmetros clínicos e Omp29

Foram utilizados os dados obtidos no estudo: “Detecção do clone JP2 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em sujeitos portadores de Periodontite Agressiva e sua correlação com parâmetros clínicos”, da aluna de iniciação científica Marcela Giudicissi, em 2016 2016, coordenado pela Profa. Dra. Luciana Saraiva, para correlacionar quantidade do clone JP2, quando presente e os parâmetros clínicos apresentados pelos pacientes, com a Omp29.

Na primeira visita, os pacientes cederam amostras de biofilme subgengival. Para a coleta, foram selecionados 4 sítios profundos de diferentes quadrantes, sendo estes com PCS ≥ 6mm ou o sítio mais profundo em cada quadrante, com sangramento à sondagem e perda óssea mensurada por meio da radiografia periapical.

Após o isolamento relativo na região de cada sítio selecionado, com roletes de algodão e jato de ar, um cone de papel esterilizado foi inserido no sulco gengival/bolsa do paciente onde permaneceu durante 20 segundos. As amostras de biofilme subgengival foram então transferidas para tubos de polipropileno, contendo 100 microlitros do tampão TE (Tris – HCl, 1mM EDTA, pH 7,6) estéril e em seguida, armazenadas em -80°C.

Nos indivíduos saudáveis, os sítios foram selecionados com PCS ≤ 3 mm, sem sangramento e sem perda óssea. Os mesmos sítios serviram para coleta após um ano em ambas as formas de PA.

O DNA foi extraído utilizando o Mini Kit de DNA Qiamp® (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, a concentração e pureza do DNA foram avaliadas em um espectrofotômetro (ND-100 Espectrofotômetro®, Nanodrop Technologies Inc., EUA).

4.6 ANÁLISES DE IgG SÉRICA CONTRA OMP29

Amostras de sangue periférico (5 ml) da veia antecubital, foram obtidas de todos os indivíduos, pelo método padrão de punção venosa, coletadas em tubos a vácuo (BD Vacutainer®, Becton, Dickson and Company, Brazil). As amostras foram colocadas em banho-maria a 30ºC por 20 minutos, então centrifugadas a 1.500 x g durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram aliquotados em tubos de microcentrífuga e armazenados a -20°C.

OBTENÇÃO DE *E. coli* RECOMBINANTE EM OMP29 E POSTERIOR PURIFICAÇÃO

O protocolo para obtenção e posterior purificação da Omp29 recombinante foi parte do projeto e tese de doutorado do então aluno Maike Paulino da Silva, intitulado: “ Omp29 de *Aggregatibacter actinomyectemcomitans*: análise filogenética, interação com proteínas da matriz e resposta de células epiteliais”., onde encontra-se todo o protocolo detalhado destas etapas.

Os fragmentos de DNA de *A. actinomyectemcomitans* que codificam Omp29 foram amplificados pela construção de oligonucleotídeos específicos e com o auxílio de um kit de purificação, o produto foi extraído do gel. A seguir, o produto foi ligado a um vetor e transformado em *E. coli* DH5- α eletrocompetente para que originasse o plasmídeo pTOPOmp29. O gene Omp29 foi obtido a partir deste plasmídeo, os iniciadores para obtenção do gene foram desenhados.

Foram realizadas as reações de amplificação e após a reação PCR o amplicon sem o peptídeo sinal foi novamente ligado ao vetor, originando um segundo plasmídeo. O vetor e o novo plasmídeo foram digeridos seguindo o protocolo e instrução do fabricante e, o fragmento Omp29 de pTOPOOmp29SPS (segundo plasmídeo) foi excisado do gel e purificado.

O fragmento Omp29 sem o peptídeo sinal foi ligado ao vetor pET28B, de acordo com recomendações do fabricante. Foi realizado um protocolo para obtenção das suspensões com as amostras recombinantes, como controle, foi utilizado o

plasmídeo sem o inserto. Além disso, os possíveis plasmídeos recombinantes foram confirmados por meio de PCR.

Para a purificação, a proteína recombinante foi denominada Omp29^{his}. Foram realizados diversos testes para determinar a melhor condição de expressão de Omp29his, bem como sua produção. Assim, a melhor condição para obtenção da proteína recombinante foi observada em meio com IPTG, na concentração de 1mM, após 2 horas de incubação a 37°. O procedimento foi repetido em maior volume, nas condições estabelecidas.

Foi obtido um precipitado contendo células de *E.coli* inoculadas, que foi ressuspendido em ureia, e as células foram submetidas à lise por sonificação. As proteínas presentes no sobrenadante foram purificadas através de cromatografia de afinidade, utilizando resina níquel quelante, conforme as instruções do fabricante , a qual verifica a presença de Omp29, a partir da cauda de histidina fusionada à proteína. Em seguida, as proteínas foram dialisadas em tampões com quantidade decrescente de ureia. As concentrações de Omp29^{his} foram mensuradas por meio do método de Bradford(1976) e analisadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 10%, como descrito por Laemmli (1970), e posteriormente corado pelo Comassie Blue (Bio-rad, CA, EUA), A proteína Omp29 possui o tamanho aproximado de 29 kDa e 34kDa, quando desnaturada (Komatzusawa et al,2002).

Ensaio Imunoenzimático (ELISA) foi usado para determinar os níveis séricos de anticorpos (IgG) reativos à Omp29. Omp29 purificada foi usada como antígeno na concentração 1:10, diluída em solução de tris-imidazole sem uréia. De acordo com o protocolo foi utilizado 1 µg/mL da proteína purificada diluída em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M (pH 9,6). Placas com noventa e seis poços (Corning–Costar®, Lowel, MA, USA) foram então sensibilizadas com 100 µL/poço da Omp29 diluída. Essas placas ficaram então encubadas por duas horas a 37ºC em estufa e a 4ºC overnight. No dia seguinte, foram lavadas três vezes com tampão de lavagem PBS/Tween 20 a 0,1% (Sigma-Aldrich, cat. P1379, St Louis, MO, USA). Os poços foram então preenchidos com 300 µL/poço de solução bloqueadora (leite desnatado Molico®, Nestlé, Brasil) a 5% em PBS/Tween 20 a 0,1%, seguindo-se a incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a remoção da solução bloqueadora, os poços foram lavados mais três vezes com o mesmo tampão de lavagem e depois receberam 100 µL/poço das amostras do soro de cada participante (em triplicata) na diluição de 1:10. As placas foram então cobertas e

levadas à 4ºC overnight. No dia seguinte novamente passaram por três lavagens com a solução de lavagem e incubação por 1 ½ hora com 100 µL/poço da solução de BSA a 1% com o anticorpo conjugado [Imunoglobulina G de carneiro anti-humana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)]. As placas foram então lavadas mais três vezes com tampão de lavagem e tiveram suas reações reveladas utilizando-se 100 µL/poço da solução reveladora, composta por ½ pastilha de ortofenilenodiamina (OPD®, Sigma-Aldrich, cat. P-8287, St. Louis, MO, EUA), 12,5 mL de tampão citrato-fosfato a 0,05M, pH5 e 5 µL de peróxido de hidrogênio. Após espera entre 10 e 30 minutos foram acrescentados 50 µL/poço de ácido sulfúrico para interromper a reação. O ponto final para a conversão do substrato enzimático foi mensurado em 490nm em um leitor de microplacas (BioRad, Hercules CA, EUA). Um controle negativo (sem amostras de soro) e amostras-controle de soro (participantes saudáveis) foram incluídos em cada placa.

Os valores de D.O. foram normalizados entre as placas, baseados nos dados obtidos para os controles. O nível de corte para reatividade do antígeno foi calculado baseado da fórmula de Desphande [normalização das D.O. = (média dos controles + 2 vezes os desvios padrões dos controles)].

4.7 ANÁLISES DE IgG SÉRICA CONTRA OS SOROTIPOS DE *A. actinomycetemcomitans*

As análises para detecção de antígenos contra os sorotipos a, b e c de *A. actinomycetemcomitans* no soro dos pacientes foram realizadas anteriormente, de acordo com Ando et al.(2010) e os resultados destes experimentos encontram-se no estudo em Saraiva et al. (2014). Os dados obtidos foram utilizados para compor as análises deste estudo, correlacionando com a resposta sérica contra Omp29, números de cópias do clone JP2 e parâmetros clínicos, nas duas formas de PA.

Amostras de sangue periférico (5 ml) da veia antecubital, foram obtidas de todos os indivíduos, pelo método padrão de punção venosa, coletadas em tubos a vácuo (BD Vacutainer®, Becton, Dickson and Company, Brasil). As amostras foram colocadas em banho-maria a 30ºC por 20 minutos, centrifugadas a 1.500 x g durante

10 minutos, os sobrenadantes foram aliquotados em tubos de microcentrifuga e armazenados a -20°C.

O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) foi usado para determinar os níveis séricos de anticorpos (IgG) reativos aos sorotipos a,b e c de *A. actinomycetemcomitans*.

Para obtenção dos antígenos de célula total foram utilizadas as cepas de referência *A. actinomycetemcomitan*s ATCC 29523, JP2 e SA 1151, respectivamente sorotipos *a*, *b* e *c.* As bactérias foram cultivadas em placas de Ágar Brucella acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Soerensen, Marília, Brasil), hemina (0,5 mg/ml) (Sigma) e menadiona (1mg/ml) (Sigma). As placas foram incubadas sob condições de anaerobiose, durante o período de 10 a 15 dias a 37°C, em câmara de anaerobiose (Plas Lab, Lansing, MI, EUA) em atmosfera de 85% N_2, 5% CO_2 e 10% H_2 (Oxilumen, São Paulo, Brasil).

Células bacterianas (fixadas com formalina) das cepas de referência descritas anteriormente foram utilizadas como antígenos (Ebersole et al.,1980). Alíquotas de 200 µL de suspensões de células inteiras de cada cepa ($D.O._{580\ nm}$ = 0.3) em um tampão carbonato (pH 9,6) foram adicionadas em cada poço e incubadas overnight a 4˚C. As diluições do soro de cada amostra dos soros dos indivíduos (1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000) foram adicionadas a cada poço e analisadas em triplicata. Os valores de D.O. foram normalizados entre as placas, baseados nos dados obtidos para os controles. A média e o desvio padrão dos valores de $D.O._{490nm}$ a partir dos poços em triplicata de cada diluição do soro foram determinados, bem como os níveis de corte para a reatividade para cada um dos antígenos utilizados.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado em um estudo piloto designado para acessar se havia uma diferença entre os grupos controle, PAG e PAL em relação ao sorotipo b no soro. Considerando uma diferença mínima de 0,2 (valor de D.O. normalizado) para ser detectado entre grupos, um poder de 80% para detectar a diferença, nível de significância de 5%, e um desvio padrão de 0,1 (valor de D.O. normalizado), um mínimo de nove indivíduos por grupo seria necessário.

O paciente foi mantido como unidade de medida e as análises estatísticas foram realizadas usando o programa STATA versão 10.0 para Windows (Stata®, College Station, TX, EUA). Dados referentes a variáveis quantitativas foram testados para normalidade usando o teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors. O teste Mann-Whitney foi empregado para avaliar diferenças intergrupos e o teste Wilcoxon foi usado para acessar as diferenças intragrupos. O teste Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn foi utilizado para investigar diferenças intergrupos.

As análises de Correlação de Spearman foram feitas para investigar possíveis relações entre variáveis quantitativas. O teste de Cochran Q foi utilizado para verificar o efeito do tratamento em uma resposta sérica positiva contra cada sorotipo e Omp29. O nível de significância de 0,05 foi estabelecido para todos os testes.

5 RESULTADOS

5.1. AMOSTRA ANALISADA

O estudo foi conduzido entre agosto de 2010 e setembro de 2011. Inicialmente foram incluídos no estudo 48 sujeitos portadores de periodontite agressiva, mas como foi um estudo longitudinal ao término de um ano conseguimos finalizar nossa proposta com 27 sujeitos (17 sujeitos com PAG, 10 sujeitos com PAL). Todos os dados clínicos, bem como as amostras de sangue foram coletados de todos os participantes tanto no início do estudo, quanto um ano após o término do tratamento periodontal. Os dados do grupo controle (10 indivíduos periodontalmente saudáveis) foram coletados somente no início do estudo.

Os dados demográficos e características clínicas de ambos os grupos estão dispostos na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Dados demográficos, clínicos e séricos

Idade **Gênero (F/M)**	**PAG** **28.4±3.9 (14/3)**		**PAL** **25.6±7.8 (6/4)**		**CONTROLES** **22.1±1.7[§] (9/1)**
	Início	1 ano	Início	1 ano	
Parâmetros clínicos					
SS (%)	56.4±24.33	26.03±20.93*	38.59±28	15.62±13.81*	5.29±4.02
Média PCS (mm) boca toda	3.59±0.77	2.8±0.45*	2.9±1.01	2.50±0.20*	2.01±0.10
Média NCI (mm) boca toda	4.17±1.05	3.66±0.91*	3.08±0.35	2.88±0.54	2.08±0.17
Detecção sérica[€]					
Aa sorotipo a	5/17	7/17	1/10	4/10	8/10
Aa sorotipo b	10/17	3/17[$]	5/10	6/10	5/10
Aa sorotipo c	12/17	2/17[$]	8/10	2/10[$]	2/10
Omp29	8/17	3/17[$]	6/10	1/10[$]	1/10

(*) Diferença significante intra-grupo (início vs 1 ano), utilizando o teste Wilcoxon
(§) Diferença significante intra-grupo (início vs 1 ano), utilizando o teste Kruskal- Wallis com comparações múltiplas de Dunn
($) Diferença significante intra-grupo (início vs 1 ano), utilizando o teste Q de Cochran.
(€) Valores de D.O. acima do nível de corte.

5.2 TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICO

O tratamento periodontal reduziu o número de pacientes com PAG que apresentavam resposta sérica positiva para o sorotipo b de *A. actinomycetemcomitans* (clone JP2), inicialmente 10/17 para 3/17 após um ano de acompanhamento ($p=0.019$). Após o tratamento também foi observada uma redução no número de indivíduos apresentando produção de anticorpos (IgG sérica) contra o sorotipo c e contra Omp29 em ambas as formas de PA (Tabela 5.1).

Os sujeitos com PA responderam ao tratamento periodontal básico associado ao uso de antibióticos e um ano após o término do tratamento, com consultas trimestrais de acompanhamento para controle periodontal, tiveram uma redução significativa na PCS ($p<0.001$) (Figura. 5.1) e NCI ($p<0.001$) (Figura 5.1) em sítios afetados (NCI > 4mm) e em sítios profundos (PCS>6mm), com ausência de diferença significante entre PAG e PAL ($p>0.05$). Considerando a efetividade da terapia (i.e. número de sítios com PCS>6mm que ao final do tratamento apresentavam PCS<4mm) também não houve diferenças significantes entre ambas as formas de PA (Figura 5.2).

Figura 5.1 - Parâmetros clínicos de PAL e PAG no início e após 1 ano de acompanhamento. Razão da média de PCS entre os sítios afetados e os sítios profundos, razão da média da PCS em sítios doentes (NCI>4 mm) e sítios profundos (PCS>6 mm); B. Razão da média de NCI entre os sítios afetados e os sítios profundos, razão da média de NCI entre os sítios doentes (NCI>4 mm) e os sítios profundos (PCS>6 mm). Teste Wilcoxon. (*) Nível de significância intra-grupo de 5% (início x 1 ano de acompanhamento)

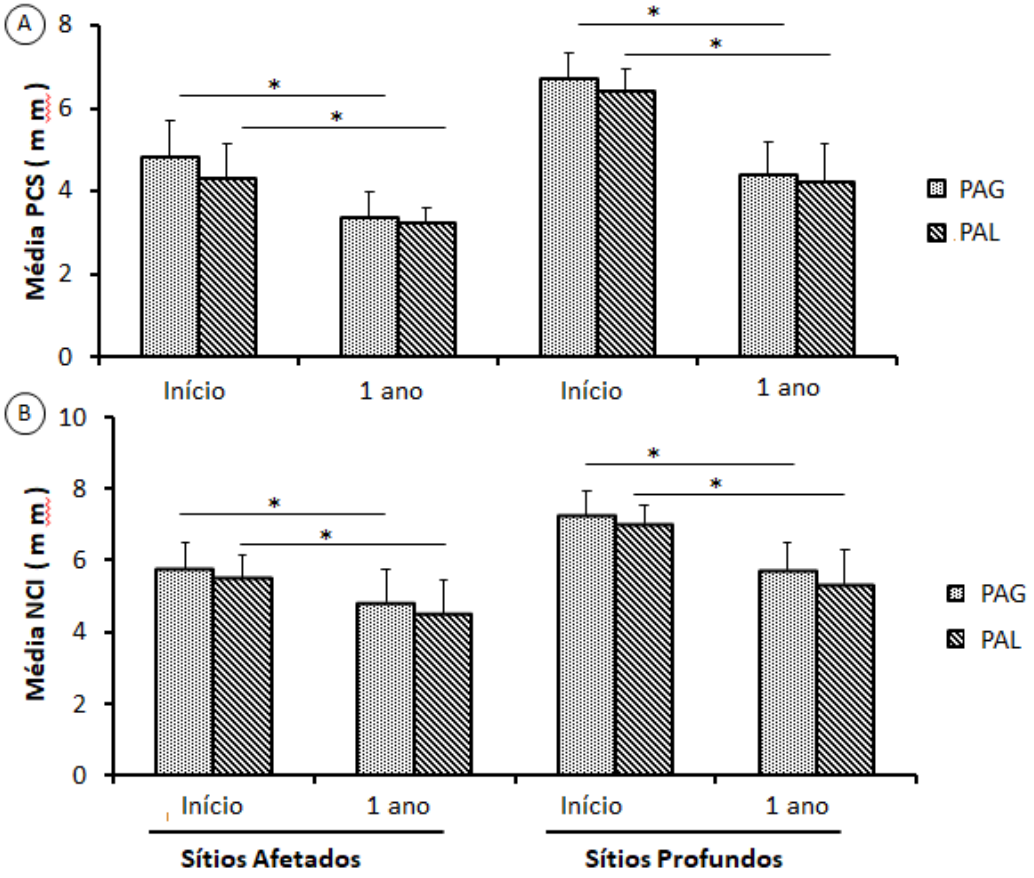
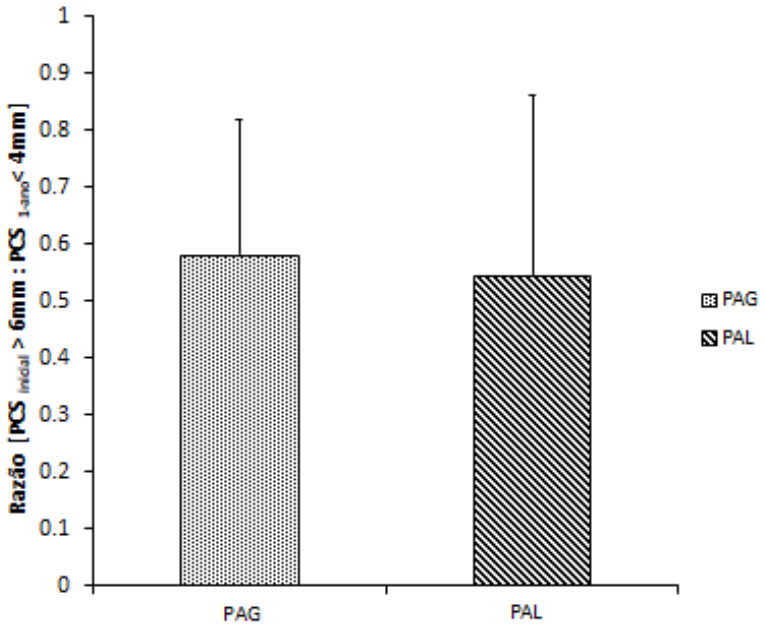
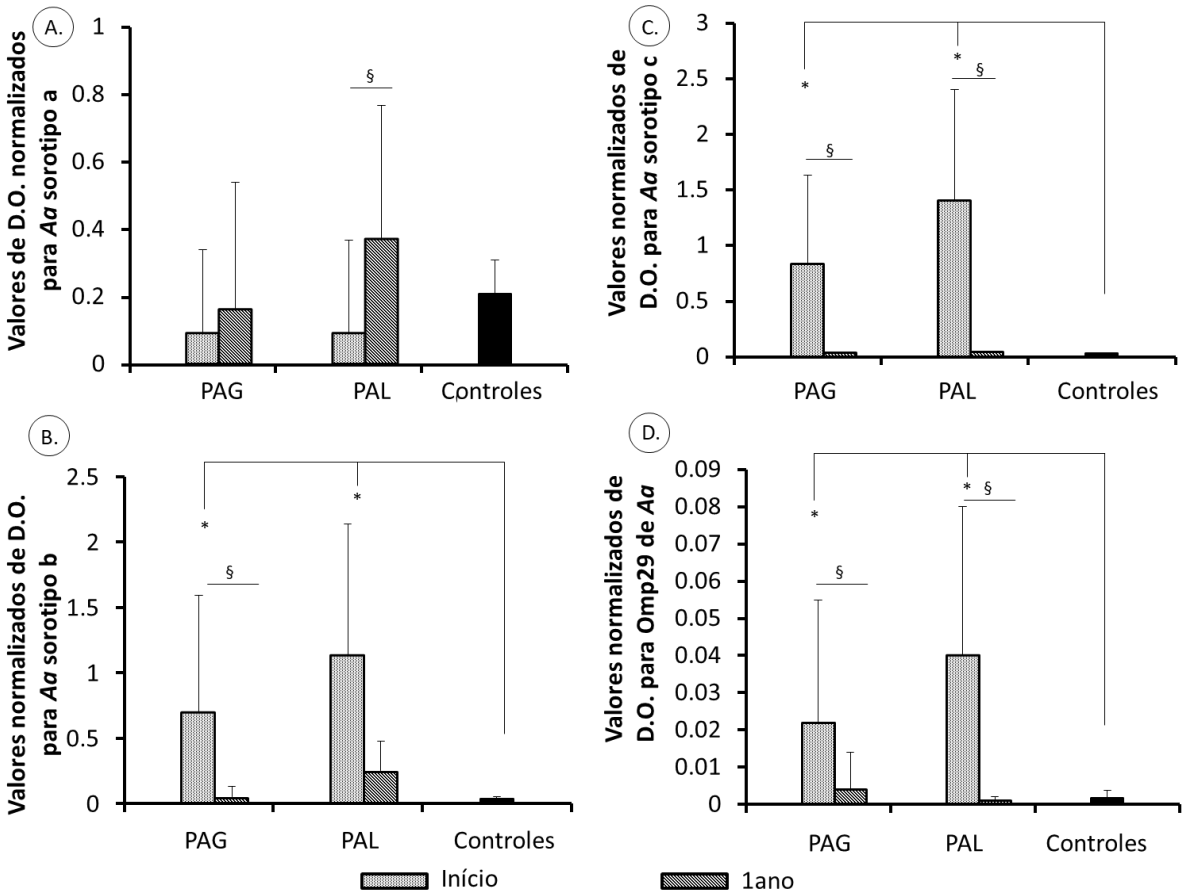


Figura 5.2 - Razão entre o número de bolsas que inicialmente apresentavam PCS>6mm e o número de bolsas que após o tratamento não-cirúrgico e após 1 ano de acompanhamento, apresentavam PCS<4mm. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as duas formas de PA (p>0,05)



Um aumento nos valores séricos contra o sorotipo a e uma redução para os sorotipos b e c foram observados em ambas as formas de PA, após 1 ano de acompanhamento, comparado ao início. No entanto, um aumento significativo foi observado para o sorotipo a apenas no grupo PAL (p=0.02), enquanto uma redução significativa de IgG contra o sorotipo b foi apenas obtida em PAG (p=0.04) (Figura 5.3). Além disso, no início, ambas as formas apresentavam resposta sérica elevada para o sorotipo b (clone JP2) e c (SA1151), inicialmente em relação aos controles saudáveis (p<0.001), mas essas diferenças não foram observadas um ano após o tratamento (p>0.05).

Figura 5.3 - Valores de D.O. (média e desvio padrão), obtidos pelo ensaio ELISA, no soro de PAL, PAG e controles contra os sorotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a (ATCC 29523), b (clone JP2) e c (SA1151) na diluição de 1:10.000 e contra Omp29 na diluição 1:10 (§) Diferença significativa intra-grupo, com nível de significância 5% usando teste Wilcoxon; (*) Diferença significativa em relação aos controles saudáveis com nível de significância 5% usando o teste Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn.

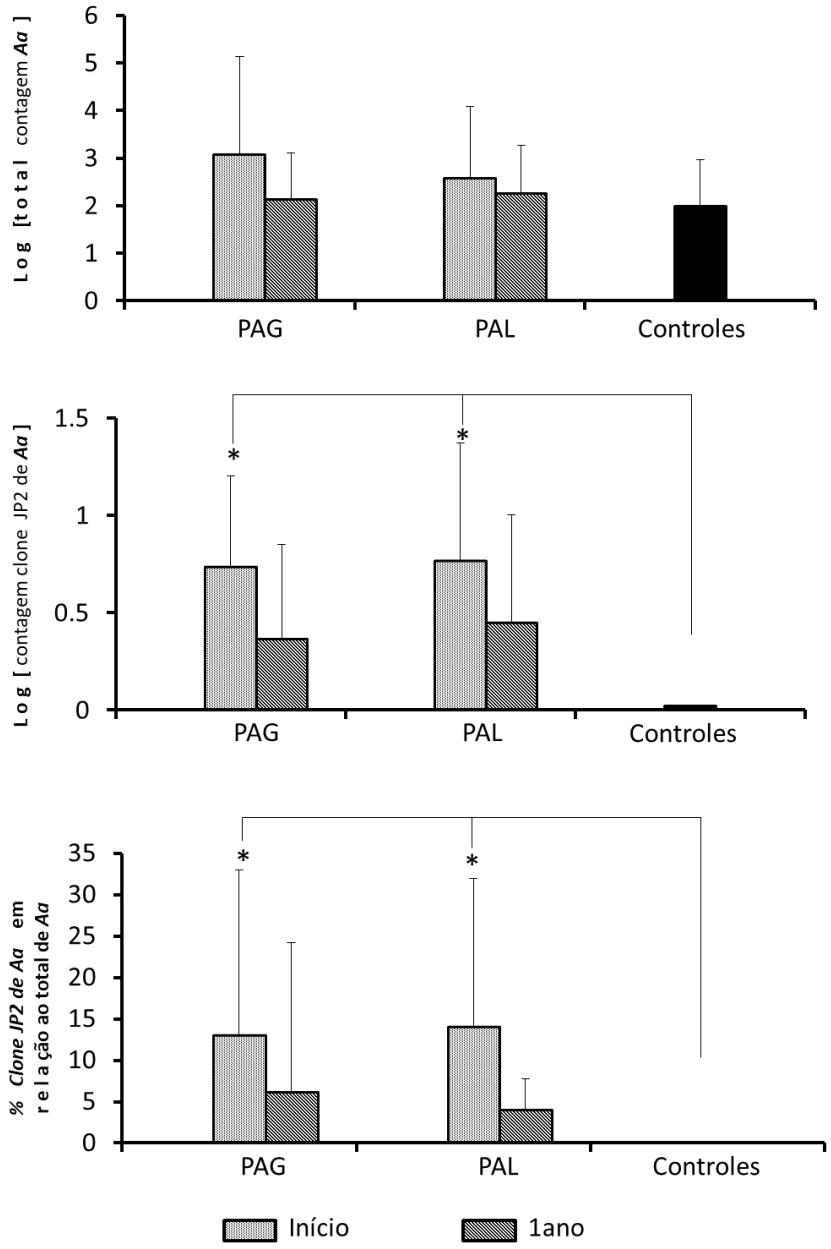


No início, uma resposta positiva contra Omp29 foi detectada em 8/17 pacientes com PAG e em 6/10 pacientes com PAL, mas um ano após o tratamento ocorreu uma significante redução nessa resposta e apenas 3/17 e 1/10 pacientes apresentavam resposta sérica positiva contra esta proteína nos grupos PAG e PAL, respectivamente (Tabela 5.1). Nesse contexto, enquanto no início ambas as formas de PA exibiam níveis séricos mais altos que os controles ($p<0.0001$), após o

tratamento a resposta sérica contra a Omp29 foi similar para ambos ($p>0.005$) (Figura 5.4).

A contagem total de *A. actinomycetemcomitans* em sítios subgengivais, incialmente e após 1 ano, entre pacientes com PA, permaneceu similar aos valores obtidos referentes aos controles saudáveis ($p>0.05$). No entanto, enquanto no início, ambas as formas de PA exibiam altos níveis do clone JP2 em relação aos controles, estes níveis tornaram-se similares aos encontrados nos indivíduos saudáveis após 1 ano. Essa redução foi observada tanto em PAG como em PAL, para o número total de cópias do clone JP2 e na porcentagem deste patógeno em relação à carga total. (Figura 5.4).

Figura5.4 - Níveis subgengivais (log) do total de A. *actinomycetemcomitans* e clone JP2 inicialmente e 1 ano após o tratamento periodontal em pacientes com PAL ou PAG e controles saudáveis. O total do clone JP2 e *A. actinomycetemcomitans* foi determinado por PCR em tempo real usando primers para região promotora *ltxA* e 16SrRNA, respectivamente. Níveis de A. *actinomycetemcomitans* foram ajustados para 6 cópias de 16SrRNA por cromossomo. (*) Uma diferença significativa em relação aos controles saudáveis com nível de 5% usando o teste Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn



5.3 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO

Houve uma correlação positiva entre os valores de PCS em sítios afetados e níveis subgengivais do clone JP2(r=0.80, p=0.0042) e uma correlação negativa entre os valores de PCS nos sítios afetados e níveis de IgG sérica contra o sorotipo a (r=0.81, p=0.003) no grupo com PAL (Tab. 2). Houve também uma correlação negativa entre os níveis subgengivais do clone JP2 e os níveis de IgG contra o sorotipo a (r=0.98, p<0.0001) (Tab.2).

Uma significante correlação positiva foi demonstrada entre os níveis do clone JP2 e a resposta de IgG sérica contra Omp29 (r=0.66, p=0.005) no grupo com PAG (Tab.2). Além disso, houve uma correlação entre resposta de IgG sérica contra o sorotipo b e o sorotipo c em pacientes com PAG (r=0.53, p=0.04) (Tab.2).

Tabela 2 - Análise de correlação para variáveis quantitativas

Formas de PA	***Correlação***	***Valor de p***	***Coeficiente de Spearman***
PAG	ΔJP2 clone *vs* ΔOmp29	0,005	0,66
	ΔSorotipo b *vs* ΔSorotipo c	0,04	0,53
PAL	ΔPCS afetados *vs* ΔSorotipo a	0,003	-0,81
	ΔPCS afetados *vs* ΔJP2 clone	0,0042	0,80
	ΔJP2 clone *vs* ΔSorotipo a	<0,0001	-0,98

ΔPCS afetados: PCS media dos sítios afetados$_{baseline,-}$ PCS média dos sítios afetados$_{-1\ ano}$; ΔJP2 clone: cópias de *Aa* clone JP2$_{baseline}$ - cópias de *Aa* clone JP2$_{1\text{-}ano}$; ΔOMP29, valor de DO para Omp29$_{início}$ - valor de DO para Omp29$_{1\text{-}ano}$; ΔSorotipo *a*, valor de DO para sorotipo $a_{início}$ - valor de DO para sorotipo $a_{1\text{-}ano}$; ΔSorotipo *b*, valor de DO para sorotipo $b_{início}$ - valor de DO para sorotipo $b_{1\text{-}ano}$; ΔSorotipo *c*, valor de DO para sorotipo $c_{início}$ - valor de DO para sorotipo $c_{1\text{-}ano}$

6 DISCUSSÃO

As periodontites eram antes classificadas em “periodontites de progressão lenta” (crônica) e de “progressão rápida” (agressiva). Porém, principalmente para a forma localizada de PA, era dificultoso estabelecer pontos de corte para o enquadramento dos pacientes, em função de fatores como localização das lesões, relação entre PAL e PAG, resposta imune do hospedeiro e idade correta de início, pois diversos pacientes começam seus tratamentos algum tempo depois que as primeiras manifestações já foram iniciadas (Fine et al., 2018) . Além disso, muitas vezes, os pacientes possuem interposição de língua e/ ou já foram submetidos a tratamento ortodôntico, situações que favoreceram a progressão da doença antes da realização de um tratamento adequado (Mafra et al., 2013). Os dados coletados para esta nova abordagem do Workshop Mundial de Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares de 2017 mostram que tanto fatores genéticos como socioeconômicos estão relacionados à suscetibilidade da doença, apesar da falta de biomarcadores que possam melhor distinguir as duas formas de PA até então subclassificadas. Além disso, PAL exibe um fenótipo único, o que requer uma análise mais apurada para um melhor enquadramento deste “antigo” tipo de PA (Caton et al., 2018; Fine et al., 2018). Assim, a PA é agora denominada de Periodontite estágio 3 ou 4, grau C, com padrão de destruição óssea inciso –molar, observado em indivíduos jovens (Tonetti et al., 2018).

Epidemiologicamente, a PA atinge principalmente mulheres e homens em proporções semelhantes (Löe et al., 1992; Susin; Albandar, 2005). Segundo Susin et al. (2014), em caucasianos, sua prevalência foi maior em indivíduos do sexo feminino. Além disso, é prevalente em afro-descendentes e em indivíduos que descendem do Oriente Médio, possuindo baixa prevalência em sujeitos caucasianos (Fine et al., 2018). Em nosso estudo, dos 27 participantes, 20 eram mulheres, e 14 eram afro descendentes, concordando com a literatura no que diz respeito ao gênero.

O tratamento periodontal consistiu em raspagem e alisamento radicular associado à antibioticoterapia sistêmica, consultas de manutenção trimestrais e rigorosa instrução de higiene bucal para controle do biofilme supragengival. Com relação ao impacto do tratamento utilizado nossos dados sugerem que a resposta

após o tratamento pôde ser comparada à resposta dos sujeitos controles , para PAL e para PAG. Há na literatura, estudos longitudinais que observaram pacientes após o tratamento, constatando estabilidade para pacientes com PAL após a terapia, e perda de inserção periodontal e dentária, para o grupo PAG (Gunsolley et al., 1995).

Todos os pacientes responderam ao tratamento periodontal proposto, resultando em melhora clínica (diminuição da PCS e aumento do NCI em sítios inicialmente afetados e profundos), da mesma maneira, em ambas as formas de PA.

Casarin et al. (2012) avaliaram desfechos clínicos, microbiológicos e imunológicos e detectaram que pacientes com PAG tratados com um protocolo que incluiu antibioticoterapia (Amoxicilina + Metronidazol), apresentaram benefícios adicionais quanto à PCS, diminuição do número de bolsas residuais e redução dos níveis de *A. actinomycetemcomitans*, quando comparados aos pacientes do grupo controle. Outros estudos anteriores também reportaram melhora nos desfechos clínicos promovidos pela terapia não cirúrgica associada aos antimicrobianos (Rabelo et al., 2015; Keestra et al., 2015). Além da qualidade do tratamento mecânico e do controle supragengival realizado pelo paciente motivado, a composição microbiana dos sítios periodontais é de extrema importância para a manutenção periodontal destes pacientes (Feres et al., 2018). Os pacientes chamados “compliance”, tem um prognóstico melhor do que aqueles que não aderem ao programa de controle e manutenção (Lang; Tonetti, 2003). Assim, a melhora clínica dos participantes do presente estudo pode ser também atribuída às consultas de manutenção periodontal e controle supragengival por parte dos pacientes (De Wet et al., 2017).

Com relação aos sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*, foram descobertos até o presente momento, sete sorotipos diferentes (a-g) (Kaplan et al., 2001; Kaplan et al., 2002), porém os mais prevalentes são os sorotipos a, b e c, avaliados neste estudo. Ao longo dos anos estes sorotipos foram avaliados em estudos transversais e de coorte, onde foi reconhecida a associação dos sorotipos b e c com doença periodontal, o que vai de encontro aos resultados obtidos em nosso estudo,o qual mostrou correlação positiva entre os sorotipos b e c, em PAG. Nosso estudo avaliou longitudinalmente o impacto do tratamento periodontal na expressão dos sorotipos e Omp29, por meio da detecção de suas respectivas respostas séricas, inicialmente e após 1 ano de acompanhamento.

Porém, dada à diversidade na prevalência destes sorotipos, estes dados podem variar, tornando praticamente impossível estabelecer um padrão para esta condição nos pacientes que abrigam tal bactéria e ainda, não é claro como esses sorotipos podem estar relacionados à resposta clínica após o tratamento periodontal (Haubek et al., 2008).

Nossos dados mostraram que houve um aumento nos valores séricos contra o sorotipo a e uma redução para os sorotipos b e c, em ambas as formas de PA, apesar de o aumento do sorotipo a ter sido observado apenas no grupo PAL, o que pode representar melhora da saúde periodontal desses indivíduos, pois o sorotipo a de *A. actinomycetemcomitans* pertence ao complexo verde, o qual corresponde às espécies compatíveis com saúde no hospedeiro (Socransky, Haffajee, Cugini, Smith, Kent,1998). Ainda, encontramos correlação negativa entre profundidade clínica de sondagem (PCS) e o sorotipo a, corroborando com nossos demais resultados e com a literatura, enquanto que a diminuição de resposta positiva para o sorotipo b foi apenas vista em PAG. Além disso, a alta resposta sérica contra os sorotipos b e c que incialmente foram obtidas, tornaram-se similares às respostas dos sujeitos-controle, após um ano. Como mencionado anteriormente, todos os pacientes apresentaram melhora clínica; sendo assim, a redução da contagem total de *A. actinomycetemcomitans* era esperada, principalmente com relação às cepas do sorotipo b por, estar associado à maior prevalência em pacientes com PA, expressando o seu potencial leucotóxico (Haubek et al., 2008) e também, do sorotipo c, por ter sido detectado em pacientes com esta condição, principalmente em estudos com sujeitos brasileiros (Cortelli et al., 2005; Teixeira et al., 2006). Estudos anteriores mostraram que sujeitos com PA exibiam notáveis aumentos de resposta de IgG sérica contra *A. actinomycetemcomitans* (Ebersole et al., 1983) e que estes anticorpos contra o patógeno seriam protetores (Gunsolley et al., 1987; Ranney et al.,1982). Saraiva et al. (2014) confirmaram uma alta resposta contra *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos com PA e seus resultados indicaram que as respostas aos sorotipos b e c foram relacionadas à doença, independente do grau de destruição tecidual.

Com relação à redução da carga total de *A. actinomycetemcomitans* pertencente ao clone JP2 em sítios afetados, podemos assumir que esse resultado podia ser esperado, uma vez que esses pacientes apresentaram melhora dos parâmetros clínicos. Burgess et al. (2017) relataram redução da presença do clone

JP2 em sítios doentes, frente ao mesmo tratamento adotado pelo nosso grupo. Além disso, observamos uma correlação negativa entre a variação da media de PCS dos sítios afetados e a variação da carga total do clone JP2, concordando com os demais dados e com a literatura.

Ao analisarmos os resultados por outra perspectiva, transformando os números obtidos a partir das análises de IgG sérica para os três sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* e Omp29 com relação às duas formas de PA e controles, em porcentagem, notaremos que inicialmente, para o sorotipo b haverá porcentagens próximas a 50% tanto na forma localizada quanto na forma generalizada, bem como nos controles. Este acontecimento provoca uma importante reflexão: a presença do microrganismo pode não ser tão importante mas a resposta imunológica pode definir o curso do status periodontal do indivíduo.

A imunoglobulina G é o mediador central das defesas do hospedeiro devido à sua habilidade de reconhecer e eliminar patógenos. Sua porção Fc tem como função ativar o sistema complemento (quando unida ao antígeno), auxiliando na fagocitose por se ligar a macrófagos, promove quimiotaxia de neutrófilos, aumenta a permeabilidade vascular e amplia a resposta inflamatória.(Ahmed AA., 2014)

Um estudo realizado por Casarin et al. (2010) analisou os níveis de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, citocinas inflamatórias e IgG espécie-específicas em pacientes com PA e PC. Assim, observaram que para *A. actinomyctemcomitans*, foram encontradas quantidades estatisticamente altas em áreas subgengivais e níveis de IgG baixos, sugerindo baixa produção de anticorpos pelos pacientes com PA. (Casarin RCV et al., 2010)

Uma possível explicação para estas diferenças pode ser o papel das citocinas pró e anti- inflamatórias que são liberadas pelo sistema imune do hospedeiro, pos células , durante a produção de anticorpos específicos ( ), dependendo do tipo e severidade da doença. Ao mesmo tempo, o perfil inflamatório dos pacientes com PAL normalmente mostra-se hiper-responsivo, liberando altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como PGE2, IL1-beta e IL-6 Analisando o perfil dos pacientes com PAG, percebe-se uma contradição na literatura pois alguns estudos falam sobre baixa responsividade de células de defesa , enquanto outros estudos remetem à ausência ou aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa. (Casarin RCV et al., 2010).

Ainda não é bem estabelecido como a redução na contagem sérica de imunoglobulinas pode ocorrer frente a mudanças na microbiota subgengival do hospedeiro e antígenos, como superfícies proteicas, podendo haver relação entre a detecção de Omp29 em altos títulos precedentes ao tratamento periodontal (Kinane et al., 1999As OMPs já foram identificadas em diversas bactérias Gram-negativas e, algumas são classificadas como porinas , receptores férricos e também como fatores de virulência que incluem adesinas, invasinas e fatores envolvidos na resistência sérica e opsonização e morte (Komatzusawa et al., 2002).

Em nosso estudo, a reposta sérica contra Omp29 que no início foi detectada nos pacientes, tornou-se similar à reposta obtida nos controles, ao final do estudo.Ainda, observamos uma correlação positiva entre as cópias do clone JP2 e os valores normalizados da resposta sérica contra Omp29. Wilson (1991) e Wilson e Hamilton (1995) demonstraram que OMPs em *A. actinomycetemcomitans*, principalmente a Omp29, reage fortemente aos soro de pacientes com PA, sugerindo uma associação com *A. actinomycetemcomitans*. Genes codificadores de Omp29 deste patógeno (Y4 – sorotipo b e NCTC9710 – sorotipo c) foram identificados (Komatzusawa et al.,1999; White et al., 1998). O sucesso do tratamento também pode ser atribuído à diminuição dos níveis de sorotipo b no soro dos pacientes e redução da proporção do clone JP2 nas bolsas periodontais, o que está de acordo com nossos dados anteriores e confirmando o aumento da expressão de Omp29 por cepas do sorotipo b (Umeda et al., 2013).

Na pesquisa de Doutorado do aluno Maike Paulino, mencionada mais cedo, foi descoberto o gene parálogo da Omp29, denominado por ele Omp29par, pela primeira vez identificado, que quando comparado com a Omp29, apresentou 76% de identidade com a sequência de nucleotídeos e 75% de identidade com a sequência de aminoácidos. Ainda neste estudo, tanto Omp29 quanto a Omp29par foram encontrados no genoma de todas as amostras de A. actinomycetemcomitans avaliados e apresentaram distância genética muito pequena.

Para entender melhor a função das duas Omp´s em questão, o grupo desenvolveu três proteínas mutantes, com remoção de determinados genes. Quando o gene ds Omp29 e o da Omp29par foram deletados simultaneamente, observou-se aumento da expressão de Omp39, provavelmente para compensar a não expressão de Omp29, sugerindo a sua importância na manutenção da integridade da bactéria. Os dados do estudo também sugeriram que a deleção do

gene parálogo não promoveu alterações no perfil da Omp29, sugerindo sua importância.

Como dito anteriormente, a alteração de IgG provavelmente pode se dar em resposta à microbiota subgengival e seus antígenos de superfície (Kinane et al.,1999). Diversos estudos avaliaram a presença de bactérias específicas e seus efeitos na resposta sérica em pacientes com PA. Considerando nossos resultados, podemos sugerir que o tratamento não cirúrgico associado à antibioticoterapia promoveu uma diminuição na carga de periodontopatógenos, como observado em estudos anteriores (Aimetti et al., 2012; Casarin et al., 2012), os quais mostram dados semelhantes, como a redução na contagem do clone JP2 após o tratamento. Consequentemente, a redução do desafio microbiano pode ter levado à redução dos níveis séricos contra os sorotipos b e c, envolvidos na patogênese da periodontite. Além disso, a baixa expressão de Omp100 e Omp29 pelo sorotipo a indica reconhecimento pelo hospedeiro, e isso resulta de processo inflamatório que pode ser prejudicado quando da colonização por este sorotipo (Umeda et al.,2013). Associando-se esta hipótese ao fato de o sorotipo a de *A. actinomycetemcomitans* pertencer ao complexo verde, como visto por Socransky et al. (1998), podemos reiterar a associação deste sorotipo com saúde periodontal, já que encontramos correlações negativas entre o sorotipo a e variáveis indicativas de virulência.

7 CONCLUSÕES

Com base nas análises, podemos observar que o tratamento periodontal resultou em:

- Diminuição dos títulos séricos de IgG para os sorotipos b e c e para Omp29 de *A. actinomycetemcomitans.*

-Diminuição da colonização do clone JP2 de *A. actinomycetecomitans* nos sítios subgengivais, levando à menor ação dos fatores de virulência encontrados inicialmente nesses indivíduos.

-Participantes com um perfil clínico e sérico similar ao dos controles periodontalmente saudáveis.

REFERÊNCIAS[1]

Ahmed AA, giddens J, Pincetic A, Lomino JV et al. Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins. J Mol Biol.2014 Dep 9; 426(18): 3166-3179.

Aimetti M, Romano F, Guzzi N, Carnevale G. Full-mouth disinfection and systemic antimicrobial therapy in generalized aggressive periodontitis: a randomized, placebo-controlled trial. J Clin Periodontol. 2012; 39. 284-294. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01795.x.

Albandar JM. Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria.Periodontol 2000, 65,13-26.DOI: 10.1111/prd.12014

Albandar JM, Brown LJ, Löe H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. J Periodontol. 1997;68:973-978. doi: 10.1902/jop.1997.68.10.973

Albandar JM, Denardin AM, Adesanya MR, Diehl SR, Winn DM. Associations between serum antibody levels to periodontal pathogens and early-onset periodontitis. J Periodontol. 2001;72(11):1463-1469. doi: 10.1902/jop.2001.72.11.1463

American Academy of Periodontology. Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. Chicago: American Academy of Periodontology,1989.

Ando ES, De-Gennaro LA, Faveri M, Feres M, DiRienzo JM, Mayer MP. Immune response to cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in periodontitis patients. J Periodontal Res. 2010. Ago;45(4):471-80. doi: 10.1111/j.1600-0765.2009.01260.x.

Armitage GC. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. Periodontol 2000. 2010 Jun;53:70-88. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00357.x.

[1] De acordo com Estilo Vancouver.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol 1999 Dec; 4(1): 1–6. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1

Asakawa R, Kawai T, Komatsuzawa H, Yamada S, Gonçalvez RB, Izumi S, et al. Outer membrane protein 100, a versatil virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Mol Microbiol 2003 Nov; 50(4):1125-39.

Asikainen S, Lai CH, Alaluusua S, Slots J. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. Oral Microbiol. Immunol.1991 Apr;6(2):115-18.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol 1999: 4: 1–6.doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1

Baehni P, Tsai CC, Mc Arthur WP, Hammond BF, taichman NS. Interaction of inflammatory cells activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. Infect Immun.1979 Apr; 24 (1):233-43.

Bolstad AL, Kristoffersen T, Olsen I, Preus HR, Jesen HB,Vasstrand EN et al. Outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* studied by SDS-PAGE and immunoblotting.Oral Microbiol .1990 Jun; 5(3):155-161.

Bos MP, Robert V, Tommassen J. Biogenesis of the gram negative bacterial outer membrane. Annu Rev Microbiol.2007;61:191-214. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093245

Brogan JM, Lally ET, Poulsen K, Kilian M, Demuth DR. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. Infect Immun. 1994 Feb; 62(2):501-508.

Burgess DK, Huang H, Harrison P, Kompotiati T, Aukhil I, Shaddox LM. Non-Surgical therapy reduces presence of JP2 clone in localized aggressive periodontitis.J Periodontol.2017 Dec;18(12):1-13. doi: 10.1902/jop.2017.170285

Butler JH. A familial pattern of juvenile periodontitis (periodontosis). J Periodontol. 1969;40: 115–118. doi: 10.1902/jop.1969.40.2.115

Casarin RCV, Del Peloso RE, Mariano FS, Nociti FS Jr et al. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans , Porphyromonas gingivalis* in generalized aggressive and chronic periodontitis. J Periodont Res 2010; 45:635-642. Doi: 0.1111/j.1600-0765.2010.01278.x

Casarin RC, Peloso Ribeiro ED, Sallum EA, Nociti FHJr, Gonçalves RB, Casati MZ.The combination of amoxicillin and metronidazole improves clinical and microbiologic results of one-stage, full-mouth, ultrasonic debridement in aggressive periodontitis treatment. J Periodontol. 2012 Aug;83(8):988–998. doi: 10.1902/jop.2012.110513

Caton GJ, Armitage G, Berglundh T .et al. A new classification scheme for periodontal and peri- implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. J Periodontol. 2018 Mar;89(Suppl 1): S1-S8. doi: 10.1002/JPER.18-0157

Chung HJ, Chung CP, Son SH, Nisengard RJ .*Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and leukotoxicity in Korean localized juvenile periodontitis. J Periodontol. 1989 Set;60(9):506-11. doi: 10.1902/jop.1989.60.9.506

Cortelli SC, Feres M, Shibli JÁ, Figueredo LC, Padilha de Oliveira V, Cortelli JR. Presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on the Community Periodontal Index (CPI) teeth in periodontally healthy individuals. J Contemp Dent Pract. 2005 Feb;15(85):93.

Da Silva- Boghossian CM, Do Souto RM, Luiz RR, Colombo AP. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. Arch Oral Biol 2011;56(9):899-906. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.02.009

Datta DB, Arden B, Henning U. Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. J Bacteriol. 1977 Sep;131(3):821-29.

De Wet LM, Slot DE, Van der Weijden GA. Supportive periodontal treatment: Pocket depth changes and tooth loss. Int J Dent Hyg. 2018 May;16(2):210-18. doi: 10.1111/idh.12290.

Di Rienzo JM, Spieler EL. Identification and characterization of the major cell envelope proteins of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun. 1983 Jan;39(1):253-61.

Dietmann A, Millonig A, Combes V, Couraud PO, Kachlany SC, Grau GE. Effects of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin on endothelial cells.Microb Pathog. 2013. Aug - Sep;61-2:43-50. doi: 10.1016/j.micpath.2013.05.001

Doğan B, Saarela M, Asikainen S. Genotyping of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype d isolates based on polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol. 1999 Dec;14(6):387-90.

Ebersole JL, Frey DE, Taubman MA, Smith DJ. An ELISA for measuring serum antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* J Periodontal Res. 1980 Nov;15(6):621-32. No abstract available.
Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ, Hammond BF, Frey DE Human immune responses to oral microorganisms. II. Serum Antibody Responses to antigens from *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and the correlation with localized juvenile periodontitis. J. Clin. Immunol.1983;3: 321-31.

Faveri M, Figueredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. J Clin Periodontol.2009 Sep;36(9):739-749. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01449.x

Feres M, Retamal-Valdes B, Mestnik MJ, Figueredo LC, Faveri M, Duarte PM,..., Pannuti CM.. The ideal time of systemic metronidazole and amoxicillin administration in the treatment of severe periodontitis: study protocol for a randomized controlled trial. Trials. 2018 Mar;19(1):201. doi: 10.1186/s13063-018-2540-8

Fernandes KP, Mayer MP, Ando ES, Ulbrich AG, Amarente-Mendes JG, Russo M. Inhibition of interferon-gamma-induced nitric oxide production in endotoxin-activated macrophages by cytolethal distending toxin. Oral Microbiol Immunol. 2008. Oct;23(5):360-6. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00434.x.

Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, McKiernan M, Gunsolley J. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescentes. J Clin Microbiol. 2007 Dec;45(12):3859-69. doi: 10.1128/JCM.00653-07

Fine DH, Patil AG, Loos BG. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. J Periodontol. 2018;89 Suppl 1:S103-S119. doi: 10.1002/JPER.16-0712.

Fine DH, Velliagounder K, Furgang D, Kaplan JB. The *Actinobacillus actinomycetemcomitans autotransporter* adhesin Aae exhibits specificity for buccal epithelial cells from humans and old world primates. Infect. Immun. 2005 Apr;73:1947-53. doi: 10.1128/IAI.73.4.1947-1953.2005

Gafan GP, Lucas VS, Roberts GJ, Petrie A, Wilson M, Spratt A. Prevalence of periodontal pathogens in dental plaque of children. J. Clin. Microbiol.2004;42(9):4141-4146. doi: 10.1128/JCM.42.9.4141-4146.2004

Gottlieb B. Die diffuse Atrophie des Alveolarknochens.Weitere Beitra¨ge zur Kenntnis des Alveolarschwundes unddessen Wiedergutmachung durch Zementwachstum. Zeitschrif¨ r Stomatol. 1923;21:195–262.

Gmur R, Mc Nabb H, van Steenbergen TF, Baehni P, Mombeli A, van Winkelhoff AJ, Guggenheinn B. Seroclassification of hitherto nontypeable Actinobacillus actinomycetemcomitans strains: evidence for a new serotype e. Oral Microbiol Immunol.1993 Apr;8(2):116-20.

Gunsolley JC, Burmeister JA, Tew JG, Best AM, Ranney RR. Relationship of serum antibody to attachment level patterns in young adults with juvenile periodontitis or generalized severe periodontitis. J Periodontol. 1987 May;58(5):314-20. doi:10.1902/jop.1987.58.5.314

Gunsolley JC, Califano JV, Koertge TE, Burmeister JA, Cooper LC, Schenkein HA. . Longitudinal assessment of early onset periodontitis. J Periodontol.1995 May; 66(5): 321-328. doi: 10.1902/jop.1995.66.5.321

Haubek D. Highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: evolutionary aspects, epidemiology and etiological role in aggressive periodontitis. APMIS Suppl. 2010 Set;(130):1-53. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02665.x.

Haubek D, Johansson A. Pathogenicity of the highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its geographic dissemination and role in aggressive periodontitis. J Oral Microbiol. 2014 Aug;6:23908. doi:10.3402/jom.v6.23980.

Haubek D, Dirienzo JM, Tinoco EM, Westergaard J, López NJ, Chung CP, Poulsen K, Kilian M. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. J Clin Microbiol. 1997 Dec;35(12):3037-42.

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort studyv Lancet Jan 2008; 371(9608): 237–42. doi:10.1016/S0140-6736(08)60135-X.

Haubek D, Poulsen K, Kilian M. Microevolution and patterns of dissemination of the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*. Infect Immun. 2007 Jun;75(6):3080-8. doi: 10.1128/IAI.01734-06

Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Annu. Rev. Microbiol. 2003;57:29-55. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090908

Kajiya M, Komatsuzawa H, Papantonakis A, Seki M, Makihira S, Ouhara K. et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Omp29 is associated with bacterial entry to gingival epithelial cells by F-actin rearrangement. PLoS One.2011;6(4):e18287. doi: 10.1371/journal.pone.0018287

Kaplan JB, Perry MB, MacLean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. Infect Immun. 2001 Sep;69(9):5375-5384.

Kaplan JB, Schreiner HC, Furgang D, Fine DH. Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* trainsislolated from localized juvenile periodontitis patients. J Clin Microbiol. 2002. Apr;40(4):1181-1187.

Keestra JA, Grosjean I, Coucke W, Quirynen M, Teughels W. . Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. J Periodontal Res. 2015 Dec; 50(6):689-706. doi: 10.1111/jre.12252

Kinane D, Mooney J, Ebersole JL. Humoral immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and Porphyromonas gingivalis in periodontal disease. Periodontol 2000.1999;20:289-340.

Kishimoto A, Fujita T, Shiba H, Komatsuzawa H, Takeda K, Kajiya M. et al. Irsogladine maleate abolishes the increase in interleukin-8 levels caused by outer membrane protein 29 from *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* through the ERK pathway in human gingival epithelial cells. J Periodontal Res. 2008 Oct;43(5):508-13. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01059.x

Komatsuzawa H, Asakawa R, Kawai T, Ochiai K, Fujiwara T, Taubman MA, et al. Identification of six major outer membrane proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans.* Gene. 2002 Apr;17;288(1-2):195-201.

Komatsuzawa H, Kawai T, Wilson ME, Taubman MA, Sugai M, Suginaka H. Cloning of the gene encoding the Actinobacillus actinomycetemcomitans serotype b Omp-A like outer membrane protein. Infect Immun.1999 Feb; 67(2):942-45.

Lang N, Bartold PM, Cullinan M. Consensus report – aggressive periodontitis. Ann Periodontol.1999 ;4:53. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.53

Lang NP, Tonetti MS. Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). Oral Health Prev Dent. 2003;1(1):7-16.
Lin J, Huang S, Zhang Q. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. Microbes Infect. 2002 Mar;4(3):325-31. Review.

Lindholm M, Aung MK, Wai NS, Oscarsson J. Role of OmpA1 and OmpA2 in Aggregatibacter actinomyectemcomitans and Aggregatibacter aphrophilus serum resistence. J Oral Microbiol.2018(11) doi: 10.1080/20002297.2018.1536192

Löe H, Anerud A, Boysen H. The natural history of periodontal disease in man: prevalence, severity, and extent of gingival recession. J Periodontol. 1992 Jun;63(6):489-95.

Longo PL, Nunes AC, Umeda JE, Mayer MP. Gene expression and phenotypic traits of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in response to environmental changes. J Periodontal Res. 2013 Dec; 48(6): 766-72. doi: 10.1111/jre.12067

Mafra CES, César Neto JB, Sekiguchi RT, Saraiva L. Impacto de um tratamento ortodôntico: relato de uma série de casos. Rev Clín Ortod Dent Press. 2013 jun-jul;12(3):95-101.

Meyer DH, Fives-Taylor PM. The role of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of periodontal disease. Trends Microbiol. 1997 Jun;5(6):224-228. doi: 10.1016/S0966-842X(97)01055-X.

Mombelli A, Gmür R, Lang NP, Corbert E, Frey J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus. J Clin Periodontol. 1999 Aug;26(8):505-10.

Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Haemophilus aphrophilus, Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int J Syst Evol Microbiol. 2006 Set;56(Pt 9):2135-2146. doi: 10.1099/ijs.0.64207-0

Orban B, Weinmann JP. Diffuse atrophy of the alveolar bone (periodontosis). J Periodontol. 1942 Jan;13(1) 31–45.

Pajukanta R, Asikainen S, Saarela M, Alaluusua S, Jousimies-Somer H. In vitro antimicrobial susceptibility of different serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Scand J Dent Res. 1993 Oct;101(5):299-303.

Paturel L, Casalta JP, Habib G, Nezri M, Raoult D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis Clin Microbiol Infect. 2004 Feb; 10(2): 98–118.

Pinheiro ET, Kawamoto D, Ota-Tsuzuki C, Almeida LR, Nunes AC, Longo PL, et al. Analysis of genotypic variation in genes associated with virulence in *Aggregatibacter actinomycetemcomitan*s clinical isolates. J Periodontal Res. 2011 Jun;46(3):310-7. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01344.x.

Rabelo CC, Feres M, Gonçalves C, Figueredo LC, Faveri M, Tu YK,et al..Systemic antibiotics in the treatment of aggressive periodontitis. A systematic review and a Bayesian Network meta-analysis. J Clin Periodontol. 2015 Jul;42(7): 647-57. doi: 10.1111/jcpe.12427

Rabin SD, Flitton JG, Demuth DR. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces apoptosis in nonproliferating macrophages by a phosphatase-independent mechanism. -Infect Immun. 2009 Aug;77(8):3161-9. doi: 10.1128/IAI.01227-08.

Ranney RR, Yanni NR, Burmeister JA, Tew JG. Relationship between attachment loss and precipitating serum antibody to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adolescents and young adults having severe periodontal destruction. J Periodontol. 1982 Jan;53(1):1-7. doi: 10.1902/jop.1982.53.1.1

Saarela M, Asikainen S, Alaluusua S, Pyhala L, Lai CH, Jousimies-Somer H. Frequency and stability of mono- or polyinfection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. Oral Microbiol.1992 Oct;7(5): 277-79.

Saarela MH, Dogan B, Alaluusua S, Asikainen S. Persistence of oral colonization by the same *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain(s). J Periodontol. 1999. May; 70(5):504-09.

Saraiva L, Rebeis ES, Martins ES, Sekiguchi RT, Ando-Suguimoto ES, Mafra CE, Mayer MP. IgG sera levels against a subset of periodontopathogens and severity of disease in aggressive periodontitis patients: a cross- sectional study of selected pocket sites. J Clin Periodontol. 2014 Oct ; 41(20): 943-51. doi: 10.1111/jcpe.12296

Schweizer M, Henning U. Action of a major outer cell envelope membrane protein in conjugation of Escherichia coli K-12. J Bacteriol. 1977 Mar;129(3):1651-52.

Silva, Maike Paulino da. Omp29 de *Aggregatibacter actinomyectemcomitans:* análise filogenética, interação com proteínas de matriz e resposta de células epiteliais[tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas;2016.

Socransky SS. Haffajee AD. Cugini MA, Smith C, Kent Jr. RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998 Feb; 25(2): 134-44. doi:10.1111/j.1399-302X.2007.00411.x

Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. Infect. Immun. 1980;29(3):1013-20.

Slots J,, Feik D, Rams TE. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and Bacteriorides intermedius in human periodontitis age relationship and mutual association. J Clin Periodontol. 1990 Oct;17(9):659-62.

Slots J.Update on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease. J Int Acad Periodontol. 1999 Oct; 1(4):121-6.

Sonntag I, Schwarz H, Hirota Y, Henning U. Cell envelope and shape of Escherichia coli: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. J Bacteriol. 1978 Oct;136(1):280-85.

Susin C, Albandar JM. Aggressive periodontitis in an urban population in southern Brazil. J Periodontol. 2005 Mar;76(3):468-75. doi: 10.1902/jop.2005.76.3.468

Susin C, Haas Na, Albandar JM. Epidemiology and demographics of aggressive periodontitis. Periodontol 2000. 2014;65:27-45. doi:10.1111/prd.12019

Suzuki N, Nakano Y, Kiyoura Y. Characterizing the specific coaggregation between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype c strains and Porphyromonas gingivalisATCC 33277. Oral Microbiol Immunol. 2006 Dec;21(6): 385–91. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00309.x

Takahashi T, Nishihara T, Ishihara Y et al. Murine macrophage interleukin-1 release by capsularlike serotype-specific polysaccharide antigens od Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun. 1991 Jan;59(1):18-23.

Teixeira RE, Mendes EM, Roque de Carvalho MA, Nicoli JR, Farias LM, Magalhães PP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotyp especific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. Can J Microbiol. 2006 Mar;52(3):182-8. doi: 10.1139/W05-121

Tinoco EMB, Belcli MI, Loureiro CA, Lana M,Campedelli F,Tinoco NMB, et al. Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinotnycetemcotnitans* in a Brazilian population. Eur J Oral Sci .1997 Feb;105(1): 9-14.

Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. Ann Periodontol. 1999. Dec;4(1):39-53. doi:10.1902/annals.1999.4.1.39

Tonetti M, Greenwell H, Kornman KS. Stanging and granding of periodontitis. Framework and porposal of a new classification and case definition. J Periodontol. 2018 Jun;89 Suppl 1: S159-S172. doi: 10.1002/JPER.18-0006.

Tsai CC, Mc Arthur WP, Baehnic PC, Hammond BF, Taichman NS. Extraction and partial characterization od a leucotoxin from a plaque-derived gram- negative microorganism. Infect Immun.1979 Jul;25(1):427-38.

Tsai CC, Ho YP, Chou YS, Ho KY, Wu YM, Lin YC. *Aggregatibacter(Actinobacillus) actinomycetemcomitans* leucotoxin and human periodontitis – A historic review with emphasis on JP2. Kaoshiung J Med Sci. 2018;34(4):186-93. doi: 10.1016/j.kjms.2018.01.014

Umeda JE, Longo PL, Simionato MR, Mayer MP. Differential transcription of virulence genes .in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes. J Oral Microbiol., 2013;5:21473. doi:10.3402/jom.v5i0.21473

Van Alphen L, Havekes L, Lugtenberg B. Major outer membrane protein d of Escherichia coli K12. Purification and in vitro activity of bacteriophages k3 and f-plus mediated conjugation. FEBS Lett.1977 Mar;75(1):285-290.

Van Essche M, Loozen G, Godts C et al. Bacterial antagonism against periodontopathogens. J Periodontol,2013 84(6):801-811.

Van Winkelhoff AJ, Slots J. *Actinobacillus actinomyectemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* nonoral infections. Periodontol 2000. 1999 Jun; 20:122-35.

Watanabe H, Marsh PD, Ivanyi L. Antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* identified by immunoblotting with sera from patients with localized human juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis. Arch Oral Biol. 1989;34(8):649-56.

Wilson ME. IgG antibody response of localized juvenile periodontits patients to the 29 kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontol.1991 Mar; 62(3): 211-18. DOI: 10.1902/jop.1991.62.3.211

Wilson ME, Hamilton RG. Immunoglobulin G subclass response of juvenile periodontitis subjects to principle outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans.* Infect. Immun. 1995 May;63(3):1062-69.

Wilson ME, Schifferle RE. Evidence that the serotype b antigenic determinant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 resides in the polysaccharide moiety of lipopolysaccharide. Infect. Immun.1991;59(4):1544-51.

White PA, Nair SP, Kim MJ, Wilson M, Henderson B. Molecular characterization of an outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* belonging to the OmpA family. Infect Immun. 1998 Jan;66(1):369-72.

Yamamoto M, Nishihara T, Koseki T, He T, Yamato K, Zhang YJ, et al. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in Japanese patients with periodontitis. J Periodontal Res. 1997 Nov;32(8):676-81.

Zambon JJ, Christersson LA, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J Periodontol. 1983 Dec;54: 707-11.doi: 10.1902/jop.1983.54.12.707

Zambon JJ, Reynolds HS, Chen P, Genco RJ. Rapid Identification of periodontal pathogens in subgingival dental plaque: comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Bacteroides gingivalis*. J Periodontol. 1985 Nov;56 Suppl 11S:32-40. doi: 10.1902/jop.1985.56.11s.32

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE PERIODONTIA

TITULO DO ESTUDO: Determinação da resposta de Imunoglobulina G sérica contra Omp29 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em pacientes portadores de Periodontite Agressiva.

PESQUISADORES: Profa. Dra. Luciana Saraiva, CD Estela Sanches Rebeis, Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer, Prof.Dr.Claudio Mendes Pannuti, CD Emmanuel de Souza Albuquerque, CD Marcela Giudicissi - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP).

LOCAL: Clinica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo-USP. Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária - São Paulo-SP.

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL:
Nome:_____
N° do Documento de Identidade: _____Sexo: M ( ) F ( )
Data de Nascimento: _____/_____ / _____
Endereço:_____
Bairro:_____Estado:_____
CEP:_____Telefone ( )_____

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Por esse instrumento declaro, para os devidos fins éticos e legais, que concordo em absoluta consciência com o acesso dos pesquisadores a minha ficha clínica para realização do presente projeto de pesquisa. Estou ciente que minha participação no estudo é voluntária e que posso retirar meu consentimento em qualquer momento da pesquisa, sem prejuízos à continuidade do tratamento.

OBJETIVOS DA PESQUISA

Esta pesquisa, “Determinação da resposta de Imunoglobulina G sérica contra Omp29 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em pacientes portadores de Periodontite Agressiva”, tem por objetivo identificar possível produção de anticorpos por pacientes portadores de Periodontite Agressiva, em resposta à presença da bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e relacionar quantidade de produção de anticorpos com fatores nocivos desta bactéria para chegar a uma melhora ou piora da doença.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

Estou ciente que sou portador da doença periodontal agressiva e declaro estar de acordo que os pesquisadores terão acesso aos dados de minhas fichas clínicas para realização da pesquisa e que posso desistir de participar da pesquisa em qualquer momento que quiser, sem perder acesso ao tratamento.

PROCEDIMENTOS

Este é um estudo retrospectivo, ou seja, não terá intervenção nenhuma ao participante da pesquisa. Serão realizadas análises de dados de material biológico já coletado anteriormente em outros estudos.

BENEFÍCIOS

A pesquisa trará maior conhecimento sobre o tema abordado, sem benefício direto para o participante da pesquisa.

RISCOS E DESCONFORTOS

Estou ciente que minha participação neste estudo envolve riscos e desconfortos mínimos, pois serão feitas análises de dados de material já coletado, não havendo qualquer intervenção no sujeito da pesquisa.

GARANTIA DE SIGILO DA IDENTIDADE DO PACIENTE

Estou ciente que apenas os pesquisadores terão acesso a qualquer informação pessoal de ficha clínica (nome, endereço, telefone e outras). Este projeto só tem interesse nas informações de saúde e nos resultados do tratamento. Fui informado que tenho a garantia do sigilo que assegura minha privacidade no estudo, e uma vez que os dados sejam obtidos, estes poderão ser divulgados em revistas e congressos científicos, mas sem a minha identidade como participante da pesquisa.

DIREITO DE DESISTIR DA PESQUISA

Estou ciente que terei a garantia de receber novos esclarecimentos que julgar necessários antes e durante o curso da pesquisa, e também terei a plena liberdade para recusar a participação na referida pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo algum ou comprometimento do tratamento.

AJUDA DE CUSTO

Não haverá ajuda de custo porque é um estudo retrospectivo, utilizando apenas dados de prontuários e material anteriormente coletado.

INDENIZAÇÃO DIANTE DE EVENTUAIS DANOS DECORRENTES DA PESQUISA

Estudo retrospectivo não pode gerar danos aos sujeitos da pesquisa.

CONTATO

Para qualquer dúvida ou ocorrência durante a pesquisa e seu atendimento, você poderá ligar para (11) 3091-7833 aos cuidados da Profa. Luciana Saraiva.

ENDEREÇO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo-SP, telefone 3091-7960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br).

CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

Eu confirmo que discuti até estar satisfeito (a) sobre a minha decisão em participar nesse estudo: “Determinação da resposta de Imunoglobulina G sérica contra Omp29 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em pacientes portadores de Periodontite Agressiva” Ficaram claros quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento ou orientação quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço. Declaro que recebi uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

São Paulo, _____ de _____de_____

Nome do Paciente:_____
RG:_____
Assinatura do Paciente
_____

Nome do Pesquisador:_____

CRO:_____

Assinatura do Pesquisador:_____

Nome do aluno:_____

CRO:_____

Assinatura do aluno:_____

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA USP - SÃO PAULO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação da resposta de Imunoglobulina G sérica contra Omp29 de Aggregatibacter actinomycetemcomitans, em pacientes portadores de Periodontite agressiva.

Pesquisador: LUCIANA SARAIVA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 77743317.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.375.394

Apresentação do Projeto:

Este estudo será uma avaliação retrospectiva de dados laboratoriais (Omp29, clone JP2 e IL-8) obtidos de pacientes previamente diagnosticados com PA, tratados na disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOUSP. A amostra deste estudo clínico foi composta por 38 sujeitos com PA, 10 deles diagnosticados com PAL e 28 com PAG. Os pacientes foram anteriormente triados para dois outros projetos: Análise da resposta sérica de IgG contra Omp29 e célula total de Aggregatibacter actinomycetemcomitans de diferentes sorotipos e contra célula total de Porphyromonas gingivalis e Tannerella forsythia de pacientes portadores de Periodontite Agressiva (PARECER 155/2010) e Análise de citocinas e de patógenos periodontais de pacientes com Periodontite Agressiva. Estudo longitudinal (PARECER 350.853/2013)

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:"Determinar a resposta de Imunoglobulina G sérica contra Omp29 de Aa, em pacientes portadores de Periodontite Agressiva em suas duas formas de manifestação."

Objetivo Secundário:"- Determinar a resposta de IgG sérica contra Omp29 e célula total de Aa dos sorotipos a, b, e c, em indivíduos com PA inicialmente e após 1 ano e sujeitos controles.- Analisar os dados referentes à presença do clone JP2 e relacioná-los ao perfil inflamatório dos pacientes;- Estabelecer uma possível relação entre Omp29 e o clone JP2 e co- relacionar com as formas de

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

periodontite agressiva e resposta sérica. -Encontrar alguma relação entre a resposta sérica contra Omp29 de Aa e a expressão de IL 8, correlacionando com o efeito no sistema imune e na resposta ao tratamento para PA."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram bem mensurados.

Riscos: Os riscos são mínimos para este estudo já que todos os dados, tanto clínicos, quanto sorológicos e microbiológicos já foram coletados e analisados.

Benefícios:"A pesquisa trará maior conhecimento sobre o tema abordado, sem benefício direto para o paciente."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e não apresenta comprometimento ético.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos apresentados estão adequados: Folha de Rosto, TCLE e Projeto Detalhado.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_997444.pdf	06/11/2017 14:57:31		Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA USP - SÃO PAULO

Continuação do Parecer: 2.375.394

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEEstelaCEPFINAL.docx	06/11/2017 14:56:39	Estela Sanches Rebeis	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoEstelaCEPFINAL.docx	06/11/2017 14:56:19	Estela Sanches Rebeis	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoassinada.pdf	22/09/2017 14:30:09	LUCIANA SARAIVA	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 10 de Novembro de 2017

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br