UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA

Perfil de Expressão Gênica de Sítios Ativos na Progressão das Doenças Periodontais Agressiva e Crônica

Ingrid Webb Josephson Ribeiro

Ribeirão Preto

2010

Ingrid Webb Josephson Ribeiro

Perfil de Expressão Gênica de Sítios Ativos na Progressão das Doenças Periodontais Agressiva e Crônica

Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Taba Júnior

Ribeirão Preto

2010

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ribeiro, Ingrid Webb Josephson Ribeiro

Perfil de Expressão Gênica de Sítios Ativos na Progressão das Doenças Periodontais Agressiva e Crônica. Ribeirão Preto, 2010.

71p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Taba Júnior, Mário

1. Expressão Gênica. 2. Periodontite Crônica 3. Periodontite Agressiva

Trabalho realizado na Clínica de Pós-graduação e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Traumatologia BMF e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número: 2007/08424-3.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ingrid Webb Josephson Ribeiro

Perfil de Expressão Gênica de Sítios Ativos na Progressão das Doenças Periodontais Agressiva e Crônica.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Periodontia

Aprovado em: ____ / ____ / 2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Lana...

...por toda a felicidade que você traz para a minha vida, por todos os erros que você transforma em acertos, por todos os sonhos que você torna realidade e por todo o amor eu serei eternamente grata!

À minha Avó Fausta e meu Avô Ewaldo (in memorian) por me apoiarem em todos os momentos da minha vida, por ser um refúgio e um porto seguro e por permitir que eu consiga realizar meus sonhos

Ao meu Pai, Obrigado por sempre me incentivar na busca de todos os meus desejos e pela possibilidade de realizar meus sonhos

Ao meu irmão Filipe, pelo amor, amizade, companheirismo, paciência, e incentivo em todas as fases da minha vida

Aos meus Irmãos Pedro e Maria Clara e à Christiane. Apesar da distância sempre me passaram força para continuar no caminho que escolhi

E finalmente ao meu marido Jefferson que com todo o seu amor, companheirismo, compreensão e inesgotável paciência esteve ao meu lado me apoiando e me incentivando ao longo do período de elaboração deste trabalho.
A você eu dedico este trabalho e todos os outros que farei
A você eu dou todas as alegrias que tenho e as que terei.
Obrigado pelo amor que me dá e espero te dar muito mais, sempre

AGRADECIMENTOS

À DEUS, Que sempre esteve do meu lado. Obrigado por me dar tudo o que preciso para ser feliz.

À Universidade de São Paulo, representada pelo reitor Prof. Dr. JOÃO GRANDINO RODAS.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, representada pelo diretor Prof. Dr. OSVALDO LUIZ BEZZON.

Ao Chefe do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, Prof. Dr. SÉRGIO LUIS SCOMBATTI DE SOUZA.

À Comissão de Pós-graduação da FORP-USP, representada pela Profa. Dra. LÉA ASSED BEZERRA DA SILVA.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação em Periodontia, Prof. Dr. ARTHUR BELÉM NOVAES JÚNIOR.

Ao meu orientador, MÁRIO TABA JÚNIOR, que me recebeu ainda como estagiária e abriu as portas da pós-graduação de Ribeirão Preto. Obrigada por sempre acreditar em mim e pelos incentivos ao longo do curso. Nunca me esquecerei das nossas conversas sobre periodontia nas clínicas e nossas reuniões semanais. Obrigada pela dedicação que dá a todos os seus orientados.

Ao Prof. Dr. ARTHUR BELÉM NOVAES JÚNIOR, por nos transmitir seu conhecimento em periodontia e nos fazer crescer como pessoa e profissional.

Ao Prof. Dr. MÁRCIO FERNANDO DE MORAES GRISI, por nos dar a oportunidade de aprender com toda sua experiência e pela paciência em nos ensinar.

À Prof. Dra. DANIELA BAZAN PALIOTO, pelos momentos agradáveis principalmente na orientação do PAE onde podemos ter um contato mais próximo

Ao Prof. Dr. SÉRGIO LUIS SCOMBATTI DE SOUZA, pelo conhecimento transmitido durante o curso.

À amiga Cintia, pelo apoio, amizade sincera e carinho incondicional desde a época da graduação. Nunca vou me esquecer de todos os momentos maravilhosos que passamos juntas.Te amo muito!!

À Karina. Obrigado por fazer esses três anos ser inesquecíveis, como dupla, amiga e confidente. Obrigado pelo apoio em todos os momentos, pela sua capacidade de trabalho que emprestou ao longo da clinica. Pela sua disponibilidade de ajudar quando possível e pela ajuda que me dá sem que eu peça.

À Luciana, que chegou para completar o trio das meninas da perio.Sempre companheira, alegre e disposta para qualquer programa- seja científico ou não. Sentirei saudade da nossa casa e nossa convivência!

Às amigas Priscila Paganini e Janine. Sem vocês não teria conseguido realizar esse trabalho. Vou me lembrar pra sempre da disponibilidade e amizade de vocês.

As minhas amigas Karin,Dayane,Robs,Dida, Lud,Bella pelos momentos agradáveis e inesquecíveis que passamos em Bauru.

À Michyele, querida amiga que conquistei no curso de especialização. Parceira de sonhos, trabalho, provas,congressos e viagens para apresentação em jornadas. Amiga, sei que a nossa amizade será para sempre!

Aos amigos dos cursos de mestrado, mestrado antigo, doutorado e pós-doutorado, PATRÍCIA GARANI, DANILO, DANIA, ANNELISSA, GERMANA, PRISCILA NÓBREGA, ADRIANA, FLÁVIA, PATRÍCIA FREITAS, RAQUEL, RAFAEL e ANDRÉA pelo carinho, convívio harmonioso, conhecimento compartilhado e amizade.

Aos amigos Guilherme, Monica e Pedro pela convivência tanto na faculdade como fora dela.

Aos meus amigos da Cirurgia e Traumatologia-Buco-Maxilo-Facial: GUSTAVO, MICHEL, PATRICIO, ROGÉRIO e RENAN pelos momentos de amizade e descontração ao longo desses dois anos. E especialmente ao amigo MARCELO, que nos conquistou com sua alegria e amizade.

À toda equipe do Laboratório de Cultura de Células, que sempre me recebeu de forma carinhosa e respeitosa especialmente o ROGER, que sempre me atendeu de coração aberto e me socorreu em momentos importantes.

À FABÍOLA SINGARETTI DE OLIVEIRA, GLAUCE TREVISAN, NATÁLIA TORRES e VIVIANE pela orientação e ajuda indispensáveis na realização da parte laboratorial da dissertação.

Aos amigos da turma XL da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, por me darem a melhor graduação que alguém pode querer.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP-USP, APARECIDA DULCE NEGRETTI e TATIANA FERNANDES, meus sinceros agradecimentos, pela disposição, atenção e amizade.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, especialmente SUELI, ZILDA, MARIA DIVINA, ARACY, GALVÃO, CHINA, ISABEL E REGIANE, por tudo que fizeram, sempre com disposição, pra me ajudar nessa jornada. SUELI E ZILDA, sem a ajuda de vocês na clínica meu trabalho nunca teria sido realizado. Muito obrigada!

Aos queridos amigos e alunos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, em especial CARLOS MELONI, FERNANDA PIRAS, NATHALIA CAMPOS e KLEBER SUZUKI. Vocês tornaram possível colocarmos em prática o que aprendemos no mestrado e se tornaram não só alunos, mas grande amigos.

Aos amigos da especialização Erick, Luis, Michyele e Samuel. Nunca me esquecerei dos nossos anos no centrinho.

À Profª. Drª. Ana Lucia, que me iniciou na arte da pesquisa como uma mãe que ensina o filho a engatinhar. Pela amizade, carinho, paciência e torcida constantes.

À toda minha família, em especial TIO FRED, TIA SÔNIA, MATHEUS, JULIANA E DIOGO, por todo o incentivo dado a mim e por acreditarem em meu potencial.

Aos amigos Hedilon e Tatiene, pelo carinho e amizade de vocês

A todos os PACIENTES, por sua paciência, confiança e disponibilidade.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, pelo auxílio financeiro à minha pesquisa, e à COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR, pela bolsa de mestrado concedida.

A todos que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização desse trabalho

LISTAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma da análise da expressão gênica por PCR Array 38

Figura 2 – Exemplo de curva de amplificação dos genes por PCR Array 40

Figura 3 - Atividade da doença periodontal e porcentagem de sangramento à sondagem. Sítios ativos=NIC ≥ 1mm depois de 2 meses; Sítios não ativos= sítios sem perda de inserção depois de 2 meses; Sangramento= sítios que apresentaram sangramento à sondagem depois de 2 meses; Sem sangramento= sítios que não apresentaram sangramento à sondagem depois de 2 meses 45

Figura 4 - Genes expressos em relação ao controle, dos sítios ativos e não ativos em pacientes com DP agressiva. As barras localizadas no lado positivo do eixo mostram genes *up regulated* e as barras localizadas no lado negativo do eixo correspondem aos genes *down regulated* 49

Figura 5 - Genes expressos, em relação ao controle, dos sítios ativos e não ativos de pacientes com DP crônica As barras localizadas no lado positivo do eixo mostram genes com *up regulation* e as barras localizadas no lado negativo do eixo correspondem aos genes com *down regulation* 52

Figura 6 - Perfil de expressão gênica de sítios ativos da doença periodontal agressiva e crônica . O perfil de expressão gênica demonstra um padrão de resposta inflamatória diferente entre as doenças. A DP agressiva parece apresentar um padrão de genes com *up regulation* enquanto a DP crônica apresenta uma resposta com predomínio de genes *down regulated* 53

Figura 7 - Perfil de expressão gênica dos sítios não ativos da doença periodontal agressiva e crônica. O perfil de expressão gênica demonstra um padrão semelhante de resposta inflamatória para ambas as condições da doença com uma tendência a baixa-regulação dos genes quando não há atividade 54

Figura 8 – Diferenças nos perfis de expressão gênica dos sítios ativos, em relação aos sítios não ativos, entre doença periodontal crônica e agressiva. As barras indicam o número de vezes que os sítios ativos estão *up* ou *down-regulated* em relação aos sítios não ativos..... 55

Figura 9 – Diferenças nas categorias de genes expressos nos grupos DP agressiva e DP crônica. DPC Ativos = Doença Periodontal Crônica com atividade de doença; DPC Não ativos= Doença Periodontal Crônica sem atividade de doença; DPA Ativos= Doença Periodontal Agressiva com atividade de doença; DPA Não ativo= Doença Periodontal Agressiva sem atividade de doença; up= Maiores níveis de expressão (*up regulation*); down=menores níveis de expressão (*down regulation*)..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Programa do termociclador utilizado na análise da expressão gênica 39

Tabela 2 - Dados demográficos e periodontais..... 44

Tabela 3 - Genes dos sítios ativos da doença periodontal agressiva diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle 47

Tabela 4 - Genes dos sítios não ativos da doença periodontal agressiva diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle 48

Tabela 5 - Genes dos sítios ativos da doença periodontal crônica diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle 50

Tabela 6 - Genes dos sítios não ativos da doença periodontal crônica diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% porcentagem

°C: grau Celsius

AAP: Academia Americana de Periodontologia

ABCF1: Cassete de ligação de ATP, subfamília F (GCN20), membro 1

BCL6:Célula-B CLL/ Linfoma 6

C3: Componente do complemento 3

C4A: Componente do complemento 4A

C5: Componente do complemento 5

CARD18: Família de domínio de recrutamento de caspase, membro 18

CCL1: Ligante de quimiocina 1 (*motif* C-C)

CCL11: Ligante de quimiocina 11 (*motif* C-C)

CCL13: Ligante de quimiocina 13 (*motif* C-C)

CCL15: Ligante de quimiocina 15 (*motif* C-C)

CCL16: Ligante de quimiocina 16 (*motif* C-C)

CCL17: Ligante de quimiocina 17 (*motif* C-C)

CCL18: Ligante de quimiocina 18 (*motif* C-C)

CCL19: Ligante de quimiocina 19 (*motif* C-C)

CCL2:Ligante de quimiocina 2 (*motif* C-C)

CCL20: Ligante de quimiocina 20 (*motif* C-C)

CCL21: Ligante de quimiocina 21 (*motif* C-C)

CCL23: Ligante de quimiocina 23 (*motif* C-C)

CCL24: Ligante de quimiocina 24 (*motif* C-C)

CCL25: Ligante de quimiocina 25 (*motif* C-C)

CCL26: Ligante de quimiocina 26 (*motif* C-C)

CCL3:Ligante de quimiocina 3 (*motif* C-C)

CCL4:Ligante de quimiocina 4 (*motif* C-C)

CCL5:Ligante de quimiocina 5 (*motif* C-C)

CCL7:Ligante de quimiocina 7(*motif* C-C)

CCL8:Ligante de quimiocina 8 (*motif* C-C)

CCR1: Receptor de quimiocina 1 (*motif* C-C)

CCR2: Receptor de quimiocina 2 (*motif* C-C)

CCR3:Receptor de quimiocina 3 (*motif* C-C)

CCR4: Receptor de quimiocina 4 (*motif* C-C)

CCR5: Receptor de quimiocina 5 (*motif* C-C)

CCR6: Receptor de quimiocina 6 (*motif* C-C)

CCR7: Receptor de quimiocina 7 (*motif* C-C)

CCR8: Receptor de quimiocina 8 (*motif* C-C)

CCR9: Receptor de quimiocina 9 (*motif* C-C)

CD40LG: Ligante CD40

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CEBPB: CCAAT/ proteína intesificadora de ligação (C/EBP), beta

células NK: *Células Natural Killer*

CRP: Proteína C-reativa,relacionada à pentaxina

Ct: ciclo limiar (*cicle threshold*)

CX3CR1: Receptor de quimiocina 1 (*motif* C-X3-C)

CXCL1: Ligante de Quimiocina 1 (*motif* C-X-C)

CXCL10: Ligante de Quimiocina 10 (*motif* C-X-C)

CXCL11: Ligante de Quimiocina 11 (*motif* C-X-C)

CXCL12: Ligante de Quimiocina 12 (*motif* C-X-C)

CXCL13: Ligante de Quimiocina 13 (*motif* C-X-C)

CXCL14: Ligante de Quimiocina 14 (*motif* C-X-C)

CXCL2: Ligante de Quimiocina 2 (*motif* C-X-C)

CXCL3: Ligante de Quimiocina 3 (*motif* C-X-C)

CXCL5: Ligante de Quimiocina 5 (*motif* C-X-C)

CXCL6: Ligante de Quimiocina 6 (*motif* C-X-C)

CXCL9: Ligante de Quimiocina 9 (*motif* C-X-C)

DL: sítio disto lingual

DNA: ácido desoxirribonucléico

DP: Doença periodontal

DPA: Doença periodontal agressiva

DPC: Doença periodontal crônica

DV: sítio disto vestibular

GAPDH: *Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*

IFNA2: Interferon alfa 2

IL10: Interleucina 10

IL10RA: Receptor de Interleucina 10, alfa

IL10RB: Receptor de Interleucina 10, beta

IL13: Interleucina 13

IL13RA1: Receptor de Interleucina 13, alfa 1

IL17C: Interleucina 17C

IL1A: Interleucina 1, alfa

IL1B: Interleucina 1, beta

IL1F10: Família da Interleucina 1, membro 10 (theta)

IL1F5: Família da Interleucina 1, membro 5 (delta)

IL1F6: Família da Interleucina 1, membro 6 (epsilon)

IL1F7: Família da Interleucina 1, membro 7 (zeta)

IL1F8: Família da Interleucina 1, membro 8 (eta)

IL1F9: Família da Interleucina 1, membro 9

IL1R1: Receptor de Interleucina 1, tipo 1

IL1ra: Interleucina 1ra,

IL1RN: Receptor antagonista de Interleucina 1

IL1α: Interleucina 1α

IL22: Interleucina 22

IL5: Interleucina 5

IL5RA: Receptor de Interleucina 5, alfa

IL6: Interleucina 6

IL8: Interleucina 8

IL8RA: Receptor de Interleucina 8, alfa

IL8RB: Receptor de Interleucina 8, beta

IL9: Interleucina 9

IL9R: Receptor de Interleucina 9

IP: Índice de placa

IP-10: proteína-10 induzível por interferon -g

L: sítio lingual

LPS: Lipopolissacarídeos bacterianos

LTA: Linfotoxina alfa (Superfamília TNF, membro 1)

LTB: Linfotoxina beta (Superfamília TNF, membro 3)

LTB4R: Receptor de Leucotrieno B4

MCP-1: Proteína-1 quimiotática para Monócito

mg: miligrama

MIF: Fator inibitório de migração de macrófago

MIP-1α: Proteína-1 alfa inflamatória de macrófago

mL: mililitro

ML: sítio mesio lingual

mm: milímetro

MV: sítio mesio vestibular

NCI: Nível clínico de inserção

NIR: Nível clínico de inserção relativo

PGE_2: prostaglandina E2

PI: perda de inserção

PS: Profundidade de sondagem

RANTES: Quimiocinas Reguladas sob Ativação Normalmente Expressada e Secretada por células T

***Real-time* PCR**: reação em cadeia de polimerase em tempo real

RNA: ácido ribonucléico

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro

RNAse: enzima ribonuclease

SCYE1: Pequenas subfamílias de indução de citocinas E, membro 1 (ativação de monócitos endoteliais)

SPP1: Fosfoproteína 1 secretada

SS: Sangramento à sondagem

TNF: Fator de necrose tumoral (Superfamília TNF, membro 2)

TOLLIP: Proteína de interação Toll

V: sítio vestibular

XCR1: Receptor de quimiocina 1 (*motif* C)

µg: micrograma

µl: microlitro

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A Periodontite é uma doença inflamatória que se caracteriza pela perda de inserção e perda óssea ao redor dos dentes, associada à formação de bolsas periodontais devido à migração apical do epitélio juncional. Atualmente é uma das principais causas de perda dentária em adultos(Silva, Garlet *et al.*, 2007). Sabe-se que possui caráter multifatorial, mas sua etiopatogenia principal está relacionada à presença de biofilme bacteriana (Flemmig, 1999). A doença periodontal apresenta ciclos de exacerbação e remissão e as perdas de inserção ocorrem de forma sítio específico (Page, Offenbacher *et al.*, 1997).

De acordo com a Academia Americana de Periodontia (Annalsofperiodontology, 1999) a doença periodontal pode ser classificada em crônica e agressiva. A primeira evolui com uma perda de inserção lenta ou moderada e está geralmente relacionada com adultos. A periodontite agressiva já apresenta perda de inserção mais rápida e destruição óssea severa e pode estar relacionado ao tipo de resposta do hospedeiro (Gilbert, Shelton *et al.*, 2005).

Em termos gerais, a destruição dos tecidos periodontais pode ser causada pela ação direta de toxinas bacterianas ou mesmo pela liberação de mediadores biológicos das células de defesa ativadas (Taba, Kinney *et al.*, 2005).

Numerosos estudos (Silva, Garlet *et al.*, 2007; El-Awady, Messer *et al.*, 2010) têm relatado o papel de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios na doença periodontal. Contudo, o potencial do mapeamento da expressão gênica ainda merece ser explorado para melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no estabelecimento, progressão e atividade da doença.

Assim, uma melhor compreensão da resposta do hospedeiro e dos mecanismos de defesa envolvidos na doença periodontal certamente contribuirão para o estabelecimento de abordagens terapêuticas mais específicas e potencialmente mais previsíveis.

Dessa forma, este estudo teve como objetivos (i) avaliar o perfil de expressão gênica nas condições de saúde gengival e de doença periodontal, (ii) identificar possíveis diferenças na expressão de genes relacionados à resposta inflamatória entre as doenças periodontais crônica e agressiva e (iii) buscar evidências do papel imuno-regulador da resposta do hospedeiro nas lesões ativas com destruição periodontal.

RESUMO

RESUMO

Introdução: A periodontite é uma doença inflamatória crônica, de alta prevalência na população, que causa perda dentária. A progressão da doença ocorre por meio de surtos, com períodos de remissão e exacerbação. A análise da expressão gênica de lesões ativas na progressão das doenças periodontais pode demonstrar diferenças na resposta do hospedeiro e indicar processos relacionados à atividade destrutiva da doença.

Metodologia: Foram selecionados 54 pacientes, sendo 18 com Doença Periodontal Agressiva (DPA), 25 com Doença Periodontal Crônica (DPC) e 11 com ausência de Doença Periodontal (Controle). Medidas clínicas de profundidade de sondagem (PS), nível de inserção relativo (NIR), sangramento à sondagem (SS) e índice de placa (IP) foram obtidas em dois tempos: inicial e após tratamento na reavaliação com dois meses.

Nos pacientes com Doença Periodontal (DP), os sítios que apresentaram perda de inserção de um ou mais milímetros foram considerados ativos e os demais, não ativos. O perfil de expressão gênica, de sítios ativos e não ativos, foi obtido pela análise de biópsias gengivais com o *Real Time PCR Array*.

Resultados: Após o tratamento periodontal não cirúrgico, houve melhora significante em todos os parâmetros clínicos (PS, SS, IP; $p<0,05$) exceto para o NIR ($p>0,05$). Dos 5112 sítios tratados, aproximadamente 4% apresentam perda de inserção mesmo após o tratamento com ou sem uso de antibiótico. As doenças DPA e DPC demonstraram diferentes perfis de expressão gênica, com sítios ativos apresentando um padrão significantemente *up-regulated* em relação aos sítios não ativos.

Conclusão: A DPA e a DPC são condições clínicas que apresentam diferenças na resposta imune e a atividade destrutiva da lesão periodontal ativa pode ser reconhecida por um padrão inflamatório *up-regulated* de resposta. Considerando-se as diferenças observadas, abordagens terapêuticas individualizadas e capazes de modular a resposta poderiam potencializar o efeito benéfico da terapia anti-infecciosa e reduzir o número de sítios ativos da DP progressiva.

Palavras-Chave: Expressão Gênica, Periodontite Agressiva, Periodontite Crônica.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 28

2 MATERIAL E MÉTODOS 32

2.1 Seleção de Pacientes 32

2.2 Parâmetros clínicos periodontais avaliados: 33

2.3 Determinação da Atividade da doença 34

2.4 Tratamento Periodontal 34

2.5 Reavaliação Periodontal 35

2.6 Coleta do Tecido Gengival (biopsia) 35

2.7 Extração de RNA 35

2.8 Síntese de cDNA 36

2.9 Array através de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR Ar Ray) 36

2.10 Análise estatística 40

3 RESULTADOS 43

3.1 Parâmetros clínicos 43

3.2 Análise de expressão gênica 45

4 DISCUSSÃO 58

5 CONCLUSÃO 65

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 67

ANEXOS 70

ARTIGO

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é uma doença inflamatória que se caracteriza pela perda de inserção e perda óssea ao redor dos dentes, associada à formação de bolsas periodontais devido à migração apical do epitélio juncional. Embora a ação bacteriana seja claramente o agente iniciante da periodontite, a complexidade da microflora associada à lesão e como o hospedeiro responde ao ataque bacteriano dificultam a caracterização de marcadores específicos para a doença.(Haffajee, Socransky *et al.*, 1983; Offenbacher, 1996; Taba, Kinney *et al.*, 2005). Além disso, o próprio comportamento sítio-específico de atividade da doença dificulta o diagnóstico e a determinação de terapias para o indivíduo ou sítio doente.

Em termos gerais, a destruição dos tecidos periodontais pode ser causada pela ação direta de toxinas bacterianas ou mesmo pela liberação de mediadores biológicos das células de defesa ativadas (Taba, Kinney *et al.*, 2005). Localmente, lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos induzem monócitos, leucócitos polimorfonucleares, neutrófilos, macrófagos e outras células a liberarem interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF) e prostaglandina E (PGE_2), em que IL-1 e TNF parecem atuar na destruição de tecidos e PGE_2 na perda óssea associada com a periodontite (Aurer, Stavljenic-Rukavina *et al.*, 2005; Loss, 2005; Taba, Kinney *et al.*, 2005). O LPS também estimula a apoptose induzida das células de defesa(Ichinose, Hara *et al.*, 1990). Nesse processo, a apoptose de neutrófilos fornece o sinal para monócitos modificarem seu fenótipo, passando a produzir citocinas antiinflamatórias e a supressão de citocinas pró-inflamatórias(Berker, Kantarci *et al.*, 2005). Desta forma, o processo de apoptose parece desempenhar um papel importante na periodontite (Arakawa, Nakajima *et al.*, 2000; Graves, Jiang

et al., 2000), embora também permaneçam em aberto quais os mecanismos moleculares que participam desse processo.

As quimiocinas, moléculas fundamentais na migração e ativação de leucócitos em diferentes doenças inflamatórias, ainda não foram totalmente caracterizadas em relação à periodontite. No entanto, a expressão de receptores CCR1, CCR5, CXCR3, CCR2 e CCR3 sugerem a ocorrência concomitante de respostas tipo Th1 e Th2 e as quimiocinas RANTES, IP-10, e MCP-1 podem indicar alterações na fase da doença (Silva, Garlet *et al.*, 2005; El-Awady, Messer *et al.*, 2010). As quimiocinas MIP-1α e IP-10 e seus receptores CCR5 e CXCR3 estão relacionados à periodontite, podendo ocorrer mais frequentemente na periodontite agressiva (Kabashima, Yoneda *et al.*, 2002; Savarrio, Donati *et al.*, 2007). A expressão de MCP-1 é levemente maior em pacientes com periodontite crônica, porém não há diferença estatisticamente significante quando se compara com periodontite agressiva (Kurtis, Tuter *et al.*, 2005).

A ação das diferentes quimiocinas e citocinas, envolvidas na imunopatogênese da doença periodontal, dirige a migração e a manutenção dos diversos tipos celulares, como leucócitos polimorfonucleares, células NK (natural-killer), células dendríticas, macrófagos e linfócitos no tecido gengival. Estas células participam da reação imune e inflamatória agindo na eliminação do patógeno, na apresentação de antígenos e na produção de mais citocinas. Esse mecanismo de auto-regulação da resposta e recrutamento seletivo dos tipos celulares leva à produção de diferentes citocinas no sítio da resposta, podendo determinar a progressão ou não da doença (Garlet, Martins *et al.*, 2003).

Muitas proteínas associadas à bio-fluidos naturais, como sangue, soro, plasma, saliva, ou preparos solubilizados de biópsias, podem estar ligados a

processos biológicos de importância clínica. Dessa forma, na literatura podemos encontrar estudos como o de Kumar et al. (Kumar, Vamsi *et al.*, 2006) que utilizaram biópsias gengivais para avaliação da expressão de metaloproteinase da matriz (MMP)-8 e -9 em pacientes portadores de periodontite crônica com ou sem Diabetes Mellitus pelo método Western Blotting. César-Neto et al (2007) também utilizaram biópsias gengivais para avaliar o efeito do fumo na expressão dos genes de Interleucina (IL)-1α, 1ra, -6, -8 e -10, fator de necrose tumoral- α, MMP-2 e -8, ativador de receptor de NF-κB ligante (RANKL) e osteoprotegerina em sítios com periodontite (Cesar-Neto, Duarte *et al.*, 2007).

O potencial do mapeamento da expressão gênica ainda merece ser explorado para melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no estabelecimento, progressão e atividade da doença. Dessa forma, uma melhor compreensão da resposta do hospedeiro e dos mecanismos de defesa envolvidos na doença periodontal certamente contribuirão para o estabelecimento de abordagens terapêuticas mais específicas e potencialmente mais previsíveis.

Assim, este estudo teve como objetivos (i) avaliar o perfil de expressão gênica nas condições de saúde e de DP, por meio da análise da expressão gênica usando a tecnologia do *PCR Array Real time,* (ii) identificar possíveis diferenças na expressão de genes relacionados à resposta inflamatória entre as doenças periodontais crônica e agressiva e (iii) buscar evidências do papel imuno-regulador da resposta do hospedeiro nas lesões ativas com destruição periodontal.

MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção de Pacientes

Um total de 54 indivíduos, 25 com doença periodontal crônica (DPC), 18 com doença periodontal agressiva (DPA) e 11 sem DP, foram selecionados nas Clínicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e convidados a participar deste estudo. Os pacientes foram submetidos a uma anamnese detalhada e a um exame periodontal completo para ver se preenchiam aos critérios de inclusão. Foram fornecidas informações sobre o estudo, os objetivos, riscos e benefícios e então obtido o termo de consentimento esclarecido, devidamente assinado, seguindo o protocolo do comitê de ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (Processo n^{o} 2007.1.168.58.0).

Como critério de inclusão, os pacientes deveriam apresentar, no mínimo, 14 dentes naturais, sendo que, no mínimo 10 deles posteriores. Os pacientes DPC deveriam ter, pelo menos, 35 anos de idade e 5 dentes com profundidade de sondagem (PS) ≥ 5mm e perda de inserção ≥ 3 mm (Hernandez et al., 2006). Os pacientes com DPA deveriam ter entre 18 e 35 anos de idade e possuir 5 dentes com PS ≥ 5mm e perda de inserção ≥ 3mm, sem direta relação com fatores etiológicos clinicamente detectáveis. Os pacientes do grupo controle deveriam apresentar PS ≤ 3mm em todos os dentes e índice de placa e sangramento ≤ 20%, com alguma indicação de cirurgia estética.

Os critérios de exclusão incluíram história de tabagismo, gravidez, pacientes que apresentavam alguma inflamação crônica ou condição imunológica, como artrite, desordem gastrointestinal e ingestão de medicação como antiinflamatórios,

antibióticos, imunossupressores, ou anticoagulantes. Além disso, não poderiam ter recebido tratamento periodontal nos últimos seis meses.

2.2 Parâmetros clínicos periodontais avaliados:

Os seguintes parâmetros foram avaliados em 6 sítios por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual):

Estado de higiene bucal: A presença de biofilme foi identificada visualmente com auxílio de uma sonda periodontal[1] (sem corante). Concomitantemente a esse procedimento os pacientes receberam instruções de higiene oral, incluindo técnica de escovação, uso de fio dental e acessórios como escova interdental e de tufo único, quando necessários.

Profundidade de sondagem: A profundidade de sondagem foi medida a partir da margem gengival até o fundo da bolsa, por meio de sonda periodontal computadorizada[2].

Sangramento à sondagem: A presença do sangramento foi considerada positiva quando ocorreu em até 20s após a inserção da sonda para medida da profundidade de sondagem.

Nível de inserção: O nível de inserção relativo foi mensurado com sonda periodontal computadorizada. Essa medida foi feita com o auxílio da sonda *disk*, e foi mensurada da superfície incisal/oclusal até o fundo da bolsa.

[1] Hu-Friedy instruments, Chigago, IL, USA.
[2] Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA

2.3 Determinação da Atividade da doença

O diagnóstico da atividade da doença foi adaptado do método de tolerância (Haffajee, Socransky *et al.*, 1983). Os sítios considerados ativos foram os que apresentaram perda de inserção ≥ 1mm (equivalente a 3 vezes o desvio padrão da margem de erro de 0,3mm da sonda computadorizada) após dois meses do exame inicial. Os sítios não ativos serviram de controles dentro do mesmo indivíduo e foram definidos como aqueles com PS equivalente aos sítios ativos, mas sem perda de inserção e sem sinais de sangramento à sondagem durante o mesmo período.

2.4 Tratamento Periodontal

Os pacientes receberam tratamento periodontal básico de raspagem e alisamento radicular. A raspagem foi realizada em um intervalo de até 48 horas, com aparelho de ultra-som[3] e com curetas tipo Gracey[4] com o auxílio de anestesia local nas áreas de raspagem subgengival, se necessário. Os pacientes retornaram uma semana após o procedimento para nova instrução de higiene oral e início do controle do biofilme, feito por meio de profilaxia mensal.

Os pacientes do grupo de DP agressiva receberam antibioticoterapia - Amoxicilina 500mg 3 vezes ao dia e Metronidazol 400mg, duas vezes ao dia, durante 10 dias- iniciando um dia antes da primeira sessão de instrumentação mecânica (Van Winkelhoff, Rodenburg *et al.*, 1989; Guerrero, Griffiths *et al.*, 2005).

[3] Cavitron, Dentsply Cavitron, Long Island, NY, USA
[4] Hu-Friedy instruments, Chigago, IL, USA.

2.5 Reavaliação Periodontal

Após um intervalo de dois meses, os pacientes foram submetidos a novo exame periodontal para avaliação do IP, SS, PS e NIR com o uso da sonda computadorizada para detecção de sítios com perda de inserção ≥ 1mm (sítios ativos).

2.6 Coleta do Tecido Gengival (biopsia)

Amostras de tecido gengival (incluindo parte de tecido epitelial e conjuntivo) foram obtidas de um sítio ativo e de um não ativo, do mesmo paciente, em cirurgias de acesso para raspagem ou eliminação de bolsa periodontal. Para as amostras do grupo controle, cirurgias com finalidade estética de áreas sem sinais de doença periodontal ou inflamação gengival foram biopsiadas.

Após a coleta, as amostras foram colocadas imediatamente em nitrogênio líquido e depois foram conservadas a -80ºC para posteriormente serem submetidas à extração de RNA total e análise de expressão gênica.

2.7 Extração de RNA

Os RNAs das amostras foram extraídos utilizando-se reagente[5] para separação de RNA total e purificados[6] segundo protocolo do fabricante. Os RNAs foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante (agarose 2% contendo 2.2M

[5] Trizol, Invitrogen, Milan, Italy
[6] ArrayGrade™ Total RNA Isolation Kit – SABiosciences

de formaldeído e tampão MOPS 1X) para verificação de sua integridade, quantificados e armazenados a -80°C.

2.8 Síntese de cDNA

A partir de 1 μg de RNA total foi confeccionada a fita de cDNA (DNA complementar) por transcrição reversa.[7] Inicialmente foram adicionados à amostra de RNA, 2μl do GE (5X gDNA Elimination Buffer) e o volume final da reação foi ajustado para 10 μl com água livre de RNAse. A amostra foi submetida ao termociclador[8] a 42°C durante 15 minutos e imediatamente após esse período foi adicionado a essa amostra um coquetel, previamente preparado, contendo: 4μl do tampão BC3 (5X RT Buffer 3), 1μl do P2 (Primer and External Control Mix), 2μl do RE3 (RT Enzyme Mix 3) e 3μl de água livre de RNAse, que foi aquecida a 95°C por 5 minutos. Ao final desta reação o cDNA foi diluído com 91μl de água e estocado a -20°C até o momento do uso.

2.9 Array através de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR Ar Ray)

Para a análise da expressão gênica foi utilizado um sistema de PCR Array *Real time*[9]. A PCR Array em tempo real permitiu a análise simultânea de 84 genes envolvidos na inflamação. Além dos genes de interesse, as placas contém 5 controles endógenos que garantem sensibilidade, especificidade e alta

[7] RT^2 First Strand Kit – SABioscience (cod. C03)
[8] BioRad: CFX96, Opticon, Opticon 2, Chromo 4 (MJ Research)
[9] Biorad CFX96 System

reprodutibilidade dos resultados. Foram utilizadas 50 placas para PCR array de genes relacionados a inflamação em humanos[10]. Os genes avaliados estão descritos abaixo:

Genes de quimiocinas:

CCL1 (I-309), CCL11 (eotaxin), CCL13 (mcp-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL2 (mcp-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/eotaxin-2), CCL25 (TECK) , CCL26, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (mcp-3), CCL8 (mcp-2), CXCL1, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC/IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL2, CXCL3, CXCL5 (ENA-78 / LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9, IL8, CCL13 (mcp-4)

Receptores de quimiocinas:

CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1, IL8RA, XCR1 (CCXCR1)

Genes citocinas:

CD40LG (TNFSF5), IL10, IL13, IL17C, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL22, IL5, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, SCYE1, SPP1, TNF, IFNA2

Receptores de citocinas:

IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RA1, IL5RA, IL9R, IL1R1, IL1RN, IL8RB, LTB4R

Outros Genes envolvidos na resposta inflamatória:

ABCF1, ICEBERG (CARD18),BCL6, C3, C4A, CEBPB, CRP, C5, TOLLI

A figura 1 demonstra os passos realizados desde a obtenção do RNA até os gráficos de análise dos resultados.

[10] Human Inflammatory Cytokines & Receptors (PAHS-011) - PCR Array SuperArray®- SABiosciences

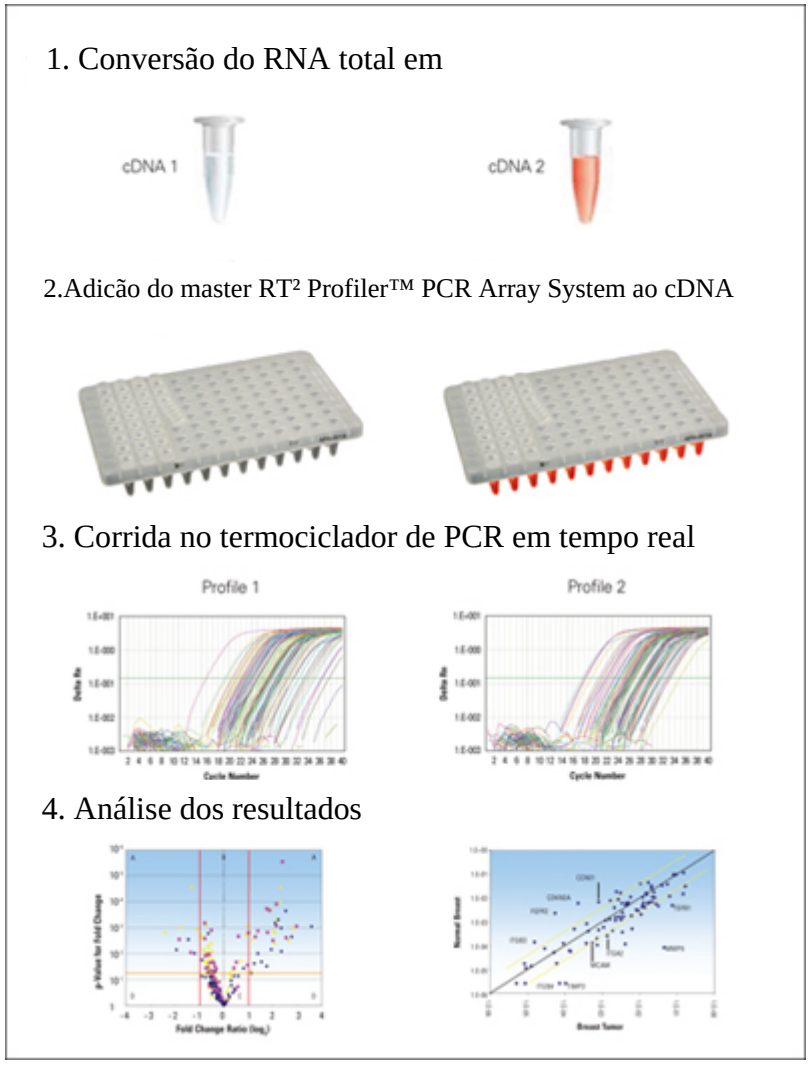

Figura 1- Fluxograma da análise da expressão gênica por PCR Array.
Esquema ilustrando o sistema de PCR em tempo real (RT² Profiler™ PCR Array System) e as fases que ocorrem desde a obtenção do RNA até a análise de resultado.

As reações foram realizadas em duplicata para cada amostra de tecido (sítio ativo, não ativo e controle). Foi utilizado para cada reação de PCR em tempo real: 1350 µl do tampão[11]; 102 µl de reação de síntese de cDNA diluído; 1248 µl de água livre de RNAse. Foram adicionados 25 µl desta mistura em cada poço da placa[12] de 96 poços já contendo pares de *primers* liofilizados para via inflamátoria e citocinas. Em seguida, a reação foi executada em um termociclador em tempo real[13]. Os

[11] 2X SuperArray RT^2 qPCR Master Mix (SyberGreen
[12] Human Inflammatory Cytokines & Receptors - PCR Array SuperArray®- SABiosciences
[13] CFX 96 – BioRad

tempos e temperaturas utilizados na amplificação dos genes estão descritos na tabela 1.

Tabela1- Programa do termociclador utilizado na análise da expressão gênica.

	Ciclos	Duração	Temperatura
BioRad CFX96, Opticon, Opticon 2, Chromo 4 (MJ Research)	1	10 minutos	95°C
	40	15 segundos	95°C
		30 a 40 segundos	55°C
		30 segundos	72°C

Biorad CFX96= nome do termociclador utilizado; Ciclos= quantidade de ciclos realizados; Duração= tempo decorrido em cada ciclo; Temperatura= temperatura alcançada durante o ciclo

Após a amplificação das amostras (figura 2), os cálculos da expressão diferencial foram realizados por um programa específico de análise de dados[14]. Os genes que apresentaram valores de ciclo *threshold* (Ct) acima de 35 foram considerados não expressos. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001). Desta forma os dados estão representados como diferença (*fold regulation*) na expressão gênica, que foi normalizada pela média geométrica de cinco genes de controle endógeno (B2M, HPRT1, RPL13A, GADPH, ACTB).

[14] RT^2 Profiler PCR Arrat Data Analysis SuperArray- SABiosciences

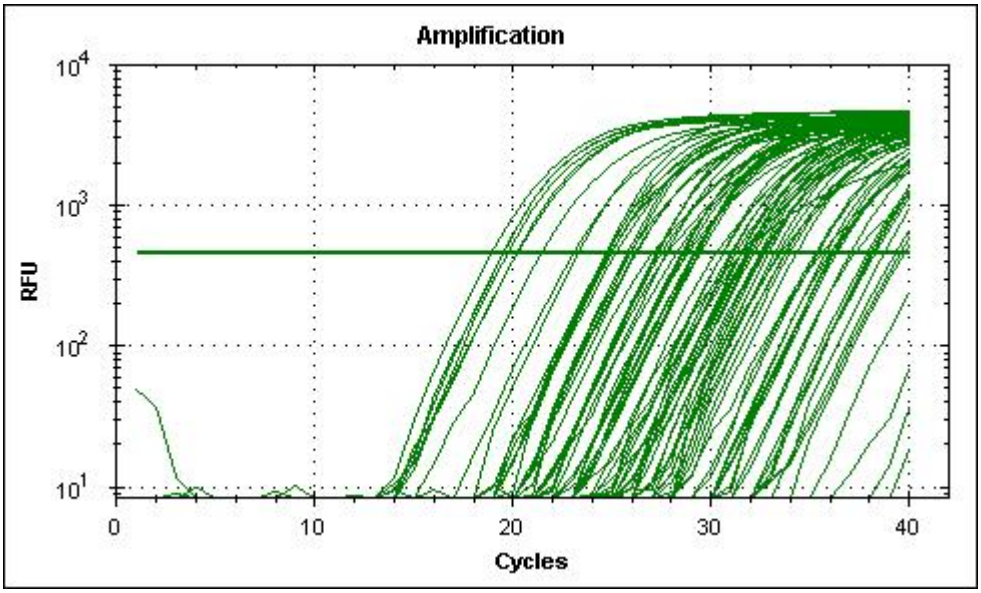

Figura 2- Exemplo de curva de amplificação dos genes por PCR Array.

2.10 Análise estatística

Parâmetros clínicos

Os dados foram registrados como média e seus respectivos desvios-padrões. Sítios específicos e indivíduos foram considerados para a análise estatística não-paramétrica. Para a comparação intra-grupos, antes e após o tratamento, foi aplicado o teste Wilcoxon, e para a comparação entre os grupos foi aplicado teste Mann-Whitney. Para a comparação da freqüência de sítios ativos e não ativos na DP agressiva e crônica utilizou-se o teste qui-quadrado. Para todas as análises estatísticas, foi adotado nível de significância de 5% ($p<0,05$).

Expressão Gênica

Análises estatísticas foram feitas utilizando um *software online* de análise de dados[15]. O programa realiza todos os cálculos de diferença de expressão baseado no ΔΔCt. Comparações dos valores de expressões gênicas aumentadas foram consideradas significantes quando essas comparações com o grupo controle apresentaram $p<0,05$.

[15] RT^2 Profiler PCR Arrat Data Analysis- SABiosciences

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Parâmetros clínicos

No total, 54 pacientes foram selecionados. Porém, 12 deles não retornaram para a reavaliação de dois meses e foram excluídos. Assim, a amostra final para análise estatística foi de 42 indivíduos, sendo 15 de DPA, 17 de DPC e 10 controles. Os dados demográficos da amostra do estudo estão presentes na tabela 2. Os parâmetros clínicos de profundidade de sondagem, nível de inserção clínica relativo, sangramento à sondagem e índice de placa foram analisados seis sítios por dente em dois tempos: inicial e reavaliação, realizada dois meses após a inicial. (tabela 2)

Nos parâmetros iniciais, a análise entre os grupos (DPC x DPA) mostrou diferença estatisticamente significante para sangramento à sondagem e índice de placa. O índice de placa inicial se mostrou menor no grupo de DPA (p=0.009) e o índice de sangramento inicial menor no grupo DPC (p=0.026) (tabela 2).

O tratamento periodontal não cirúrgico reduziu significativamente os parâmetros de profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e índice de placa para os dois grupos de doença periodontal (tabela 2).

No total foram analisados 5112 sítios, e estes foram classificados conforme atividade de doença em sítios ativos ou não ativos. Observou-se maior ocorrência de sítios ativos na DPC (p=0,009)(tabela 2).

Tabela 2 – Dados demográficos e periodontais.

	Controle	DPC	DPA	p (DPC vs DPA)
Sujeitos (n)	10	17	15	
Gênero (m/f)	1/9	6/11	4/11	
Raça (b/nb)	10	15/2	10/5	
Idade (média±dp)	29,3±3,6	44,1±6,4	30,9±3,9	
PS mm (média±dp) inicial	1,86±0,21	2,45±0,42	2,65±0,47	0,169
PS mm (média±dp) 2 meses	nd	2,08±0,37	2,11±0,35	0,842
		p<0,001	p<0,001	
NIR mm(média±dp) inicial	8±0,24	9,45±1,37	9,45±1,17	0,914
NIR mm (média±dp) 2 meses	nd	9,58±1,32	9,42±0,66	0,842
		p=0,113	p=0,073	
SS % (média±dp) inicial	15,86±7,82	42,49±19,79	56,79±22,89	0,026
SS % (média±dp) 2 meses	nd	26,12±17,77	25,43±10,28	0,772
		p<0,001	p<0,001	
IP % (média±dp) inicial	18,22±13,14	54,99±13,16	40,49±16,06	0,009
IP % (média±dp) 2 meses	nd	31,6±18,07	25,24±16,4	0,169
		p<0,001	p=0,007	
Sítios ativos (%)	nd	231 (4,5)	169 (3,3)	
Sítios não ativos (%)	nd	2397 (46,9)	2315 (45,3)	0,009

DPC= periodontite crônica; DPA= periodontite agressiva; m=masculino; f=feminino; b=branco; nb=não branco; dp=desvio padrão; PS=profundidade de sondagem; NIR=Nível de Inserção Clínica relativo; SS=Sangramento à sondagem; IP=Índice de Placa; nd=não determinado; Sítios ativos= NIC ≥ 1mm depois de 2meses

Valores de p foram obtidos pelos testes Mann-Whitney (PC vs PAg), Wilcoxon (inicial vs 2meses) e qui-quadrado (atividade dos sítios). Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão para os parâmetros avaliados

A atividade de doença foi ainda dividida conforme o parâmetro de sangramento à sondagem como pode ser acompanhado na figura 3.

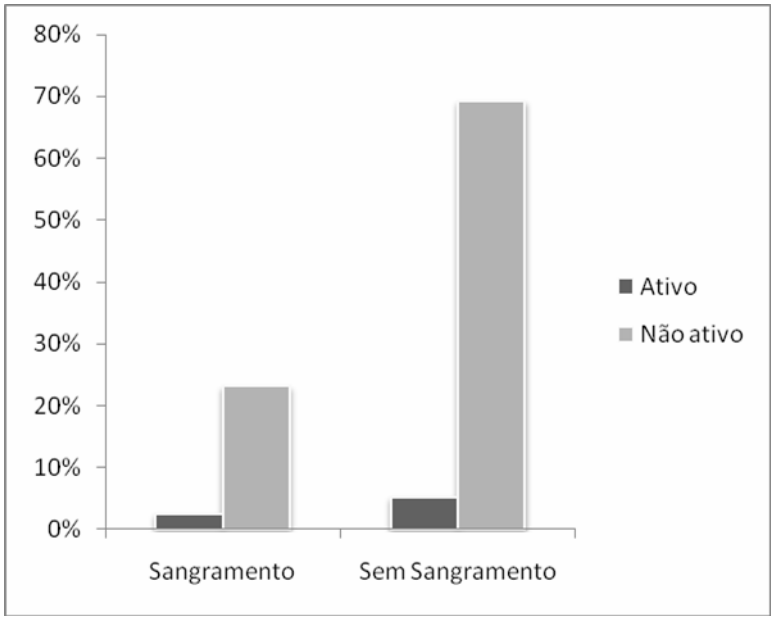

Figura 3- Atividade da doença periodontal e porcentagem de sangramento à sondagem. Sítios ativos=NIC ≥ 1mm depois de 2 meses; Sítios não ativos= sítios sem perda de inserção depois de 2 meses; Sangramento= sítios que apresentaram sangramento à sondagem depois de 2 meses; Sem sangramento= sítios que não apresentaram sangramento à sondagem depois de 2 meses.

Os sítios foram avaliados nos valores exatos de perda de inserção clínica em milímetros e 59,6% obtiveram melhora no nível de inserção clínica, ou seja, apresentaram ganho de inserção; 10,3% permaneceram estáveis, permanecendo com os mesmos valores clínicos iniciais; e em 30,1% houve perda de inserção clínica. Desses últimos 26% tiveram perda de inserção ≥ 1mm, sendo considerados como sítios ativos.

3.2 Análise de expressão gênica

Os resultados da expressão gênica nos grupos de pacientes com periodontite agressiva e crônica (sítios ativos e não ativos) foi dado pelo número de vezes (*fold*

regularion) que apresentaram expressão *up regulated* ou *down regulated* quando comparados aos pacientes controles e seus respectivos controles internos, sítios não ativos. Foram considerados somentes o genes que apresentaram expressão com nível de significância p<0,05. Os resultados estão apresentados em forma de tabelas e gráficos referentes a cada grupo de estudo.

Pacientes com periodontite agressiva

Os sítios ativos testados, quando comparados aos pacientes controles, apresentaram 56 (66,7%) genes diferencialmente expressos como mostra a tabela 3. Desses, 46 (82,1%) encontravam-se *up regulated* e 10 (17,9%) *down regulated.*

Tabela 3- Genes dos sítios ativos da doença periodontal agressiva diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle.(continua)

Gene	Fold Regulation	p-value	Função
BCL6	-2.9	0.03	outros
C3	3.2	0.02	outros
C4A	-8.1	0.02	outros
C5	4.5	0.01	outros
CCL11	3.4	0.01	quimiocina
CCL13	5.7	0.00	quimiocina
CCL15	4.3	0.04	quimiocina
CCL18	-34.9	0.04	quimiocina
CCL19	3.1	0.01	quimiocina
CCL2	2.6	0.00	quimiocina
CCL20	-16.3	0.02	quimiocina
CCL23	3.1	0.02	quimiocina
CCL26	3.7	0.00	quimiocina
CCL3	5.0	0.02	quimiocina
CCL5	2.6	0.02	quimiocina
CCL7	4.4	0.02	quimiocina
CCL8	-8.5	0.04	quimiocina
CCR1	2.6	0.02	receptor de quimiocina

Tabela 3- Genes dos sítios ativos da doença periodontal agressiva diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle.(conclusão)

Gene	Fold Regulation	p-value	Função
CCR2	4.4	0.02	receptor de quimiocina
CCR6	3.8	0.01	receptor de quimiocina
CCR7	3.9	0.04	receptor de quimiocina
CCR8	4.1	0.02	receptor de quimiocina
CCR9	5.5	0.02	receptor de quimiocina
CD40LG	3.4	0.03	citocina
CEBPB	5.4	0.00	outros
CRP	4.2	0.03	outros
CXCL1	3.8	0.01	quimiocina
CXCL10	4.4	0.04	quimiocina
CXCL13	4.5	0.00	quimiocina
CXCL14	-8.1	0.02	quimiocina
CXCL3	4.6	0.01	quimiocina
CXCL9	2.7	0.02	quimiocina
IL10	3.7	0.03	citocina
IL10RA	-3.2	0.04	receptor de citocina
IL10RB	2.4	0.04	receptor de citocina
IL13	3.2	0.01	citocina
IL13RA1	2.2	0.02	receptor de citocina
IL17C	3.0	0.02	citocina
IL1A	4.3	0.01	citocina
IL1B	2.9	0.03	citocina
IL1F8	4.4	0.01	citocina
IL1F9	5.5	0.01	citocina
IL22	4.6	0.01	citocina
IL5	4.7	0.03	citocina
IL5RA	3.7	0.01	receptor de citocina
IL8	2.5	0.04	quimiocina
IL8RA	11.8	0.00	receptor de quimiocina
IL9	4.8	0.01	citocina
IL9R	3.5	0.04	receptor de citocina
LTA	3.4	0.04	citocina
LTB	7.2	0.00	citocina
SCYE1	-6.7	0.02	citocina
SPP1	3.7	0.01	citocina
TNF	-12.5	0.05	citocina
TOLLIP	-6.7	0.04	outros
XCR1	3.1	0.03	receptor de quimiocina

Gene=gene expressado de forma significante em relação ao grupo controle; fold regulation= número de vezes que a expressão está aumentada ou diminuída em relação ao grupo controle; p = valor de p; outros = outros genes envolvidos na resposta inflamatória

Os sítios não ativos testados, quando comparados aos pacientes controles, apresentaram 22 (26,2%) genes expressos diferencialmente como mostra a tabela 4. Desses, 9 (40,9%) encontravam-se *up regulated* e 13 (59,1%) *down regulated*.

Tabela 4- Genes dos sítios não ativos da doença periodontal agressiva diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle.

Gene	Fold Regulation	p-value	Função
BCL6	-3.8	0.02	outros
C4A	-12.6	0.04	outros
CCL18	-26.6	0.04	quimiocina
CCL2	1.8	0.00	quimiocina
CCL23	-42.8	0.02	quimiocina
CCL26	-3.3	0.01	quimiocina
CCL8	-16.7	0.03	quimiocina
CEBPB	-5.6	0.03	outros
CXCL1	5.4	0.00	quimiocina
CXCL11	-34.7	0.04	quimiocina
CXCL13	3.4	0.01	quimiocina
CXCL14	-7.2	0.02	quimiocina
CXCL3	3.7	0.02	quimiocina
IL13	-80	0.05	citocina
IL13RA1	1.8	0.04	receptor de citocina
IL1F9	3.0	0.03	citocina
IL8	2.9	0.03	quimiocina
LTB	7.3	0.00	citocina
IL8RA	4.5	0.01	receptor de quimiocina
MIF	-0.4	0.03	citocina
SCYE1	-5.9	0.02	citocina
TOLLIP	-12.5	0.03	outros

Gene=gene expresso de forma significante em relação ao grupo controle; fold regulation= número de vezes que a expressão está aumentada ou diminuída em relação ao grupo controle; p-value= valor de p; outros = outros genes envolvidos na resposta inflamatória.

Além dos perfis de expressão dos sítios ativos e não ativos comparados ao controle também comparamos os níveis de expressão entre os dois sítios (figura 4).

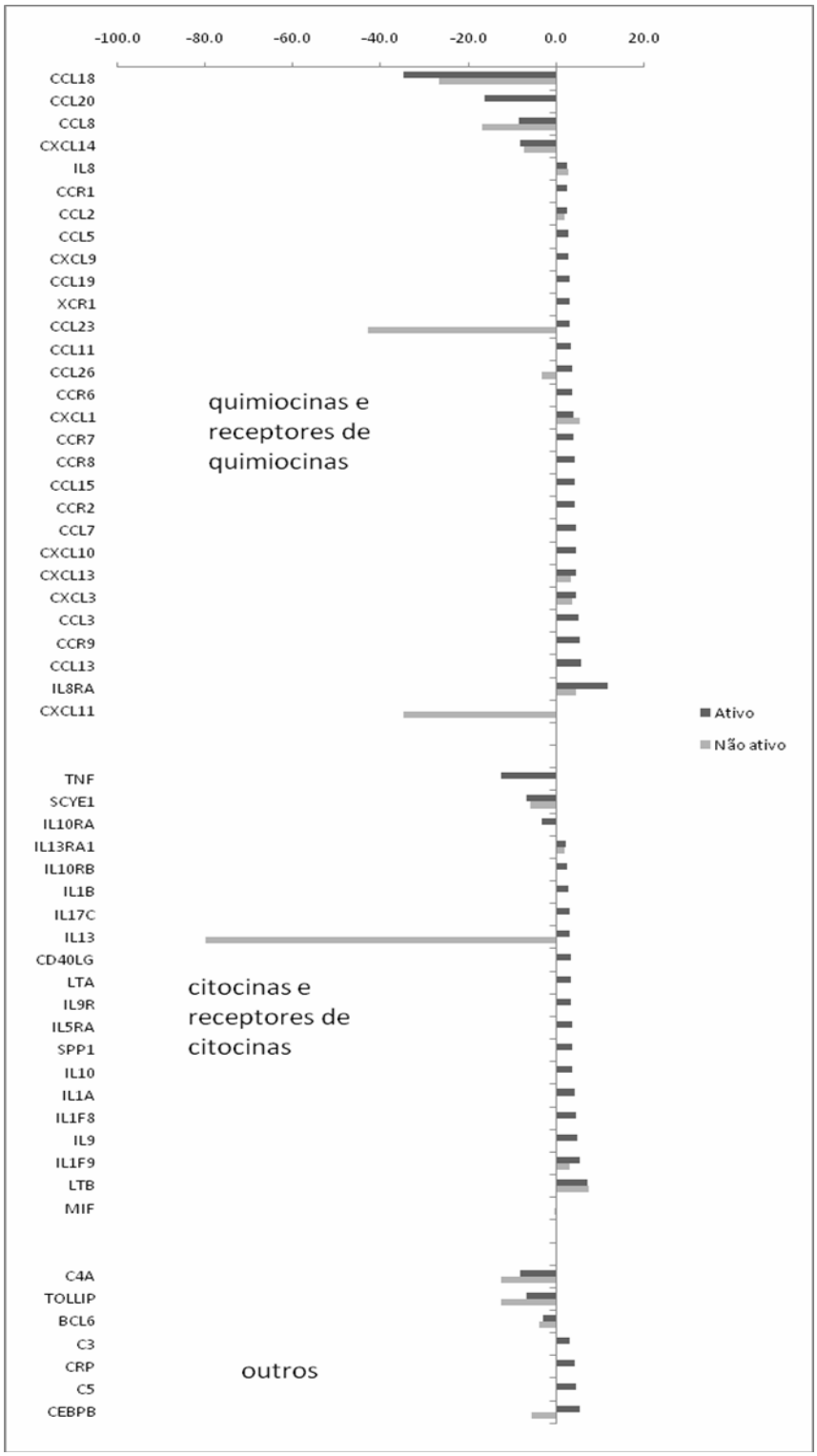

Figura 4- Genes expressos em relação ao controle, dos sítios ativos e não ativos em pacientes com DP agressiva. As barras localizadas no lado positivo do eixo mostram genes *up regulated* e as barras localizadas no lado negativo do eixo correspondem aos genes *down regulated.*

Pacientes com periodontite crônica

Os sítios ativos dos pacientes com periodontite crônica analisados, quando comparados aos pacientes controles, apresentaram 28 (33,3%) genes expressos diferencialmente como mostra a tabela 5. Desses, 5 (17,9%) encontravam-se *up regulated* e 23 (82,1%) *down regulated*.

Tabela 5- Genes dos sítios ativos da doença periodontal crônica diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle.

Gene	Fold Regulation	p-value	Função
BCL6	-2.3	0.04	outros
C4A	-50	0.04	outros
CCL18	-21.7	0.04	quimiocina
CCL19	-30.4	0.04	quimiocina
CCL2	-1.1	0.00	quimiocina
CCL23	-27.2	0.02	quimiocina
CCL26	-5.2	0.03	quimiocina
CCL5	-17.7	0.04	quimiocina
CCL8	-55.6	0.03	quimiocina
CCR1	-22.3	0.04	receptor de quimiocina
CEBPB	-7.6	0.02	outros
CXCL1	2.5	0.04	quimiocina
CXCL10	7.0	0.00	quimiocina
CXCL11	-50	0.04	quimiocina
CXCL13	-4.1	0.02	quimiocina
CXCL14	-6.7	0.02	quimiocina
CXCL6	-56.1	0.05	quimiocina
CXCL9	-22.7	0.04	quimiocina
IL10RA	-5.7	0.02	receptor de citocina
IL13	-50	0.05	citocina
IL13RA1	3.0	0.01	receptor de citocina
IL1RN	12.2	0.01	receptor de citocina
IL8	-20.4	0.05	quimiocina
LTB	12.9	0.00	citocina
MIF	-3.3	0.02	citocina
SCYE1	-4.1	0.03	citocina
TNF	-11.1	0.05	citocina
TOLLIP	-20.0	0.03	outros

Gene=gene expresso de forma significante em relação ao grupo controle; fold regulation= número de vezes que a expressão dos genes está aumentada ou diminuída em relação ao grupo controle; p-value= valor de p; outros = outros genes envolvidos na resposta inflamatória.

Os sítios não ativos testados, quando comparados aos pacientes controles, apresentaram 26 (31%) genes expressos diferencialmente como mostra a tabela 6. Desses, 4 (15,4%) encontravam-se *up regulated* e 22 (84,6%) *down regulated*.

Tabela 6- Genes dos sítios não ativos da doença periodontal crônica diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle.

Gene	Fold Regulation	p-value	Função
BCL6	-4.2	0.02	outros
C4A	-37.2	0.05	outros
CCL18	-45.6	0.04	quimiocina
CCL19	-8.6	0.04	quimiocina
CCL2	-1.6	0.01	quimiocina
CCL23	-43.7	0.02	quimiocina
CCL26	-8.3	0.01	quimiocina
CCL5	-12.9	0.04	quimiocina
CCL8	-45.6	0.02	quimiocina
CCR1	-26.1	0.04	receptor de quimiocina
CEBPB	-4.9	0.04	outros
CXCL1	3.2	0.01	quimiocina
CXCL11	-58.2	0.04	quimiocina
CXCL13	7.2	0.00	quimiocina
CXCL14	-6.8	0.02	quimiocina
CXCL9	-19.0	0.04	quimiocina
IL10RA	-15.8	0.01	receptor de quimiocina
IL13	-90	0.05	citocina
IL1F9	3.2	0.01	citocina
IL5RA	-68.1	0.05	receptor de citocina
IL8	-23.0	0.05	quimiocina
LTB	7.2	0.00	citocina
MIF	-2.1	0.04	citocina
SCYE1	-5.8	0.02	citocina
TNF	-14.8	0.04	citocina
TOLLIP	-12.3	0.03	outros

Gene=gene expresso de forma significante em relação ao grupo controle; fold regulation= número de vezes que a expressão está aumentada ou diminuída em relação ao grupo controle; p-value= valor de p; outros genes envolvidos na resposta inflamatória

Foram comparados dentro da DPC os sítios ativos com os sítios inativos e o perfil de expressão gênica está representado na figura 5.

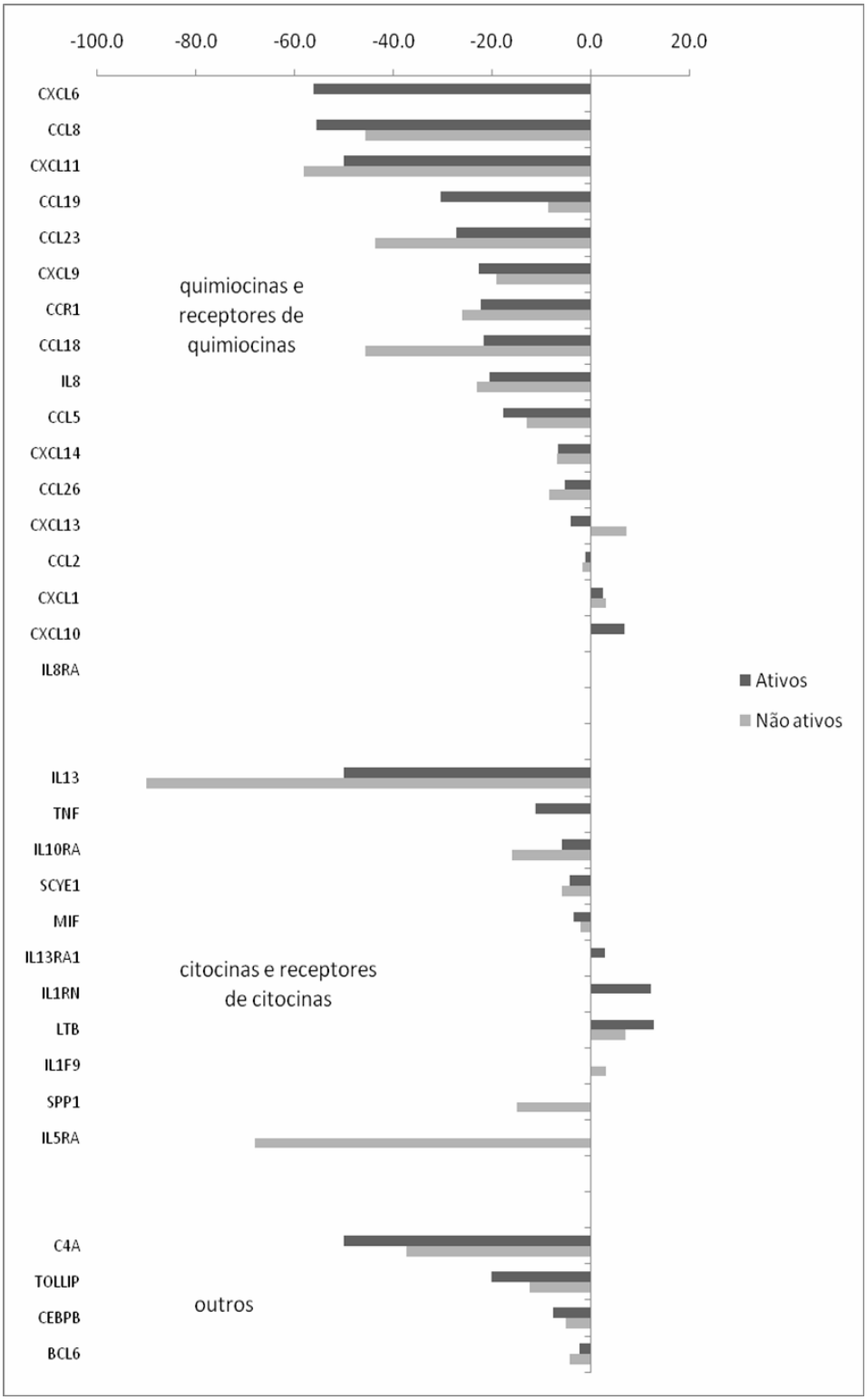

Figura 5- Genes expressos, em relação ao controle, dos sítios ativos e não ativos de pacientes com DP crônica As barras localizadas no lado positivo do eixo mostram genes com *up regulation* e as barras localizadas no lado negativo do eixo correspondem aos genes com *down regulation.*

Perfil de expressão gênica entre DPC e DPA

Foram realizadas comparações entre DPA e DPC quanto a atividade de doença e comparou-se sítios ativos (figura 6) e sítios não ativos (figura 7).

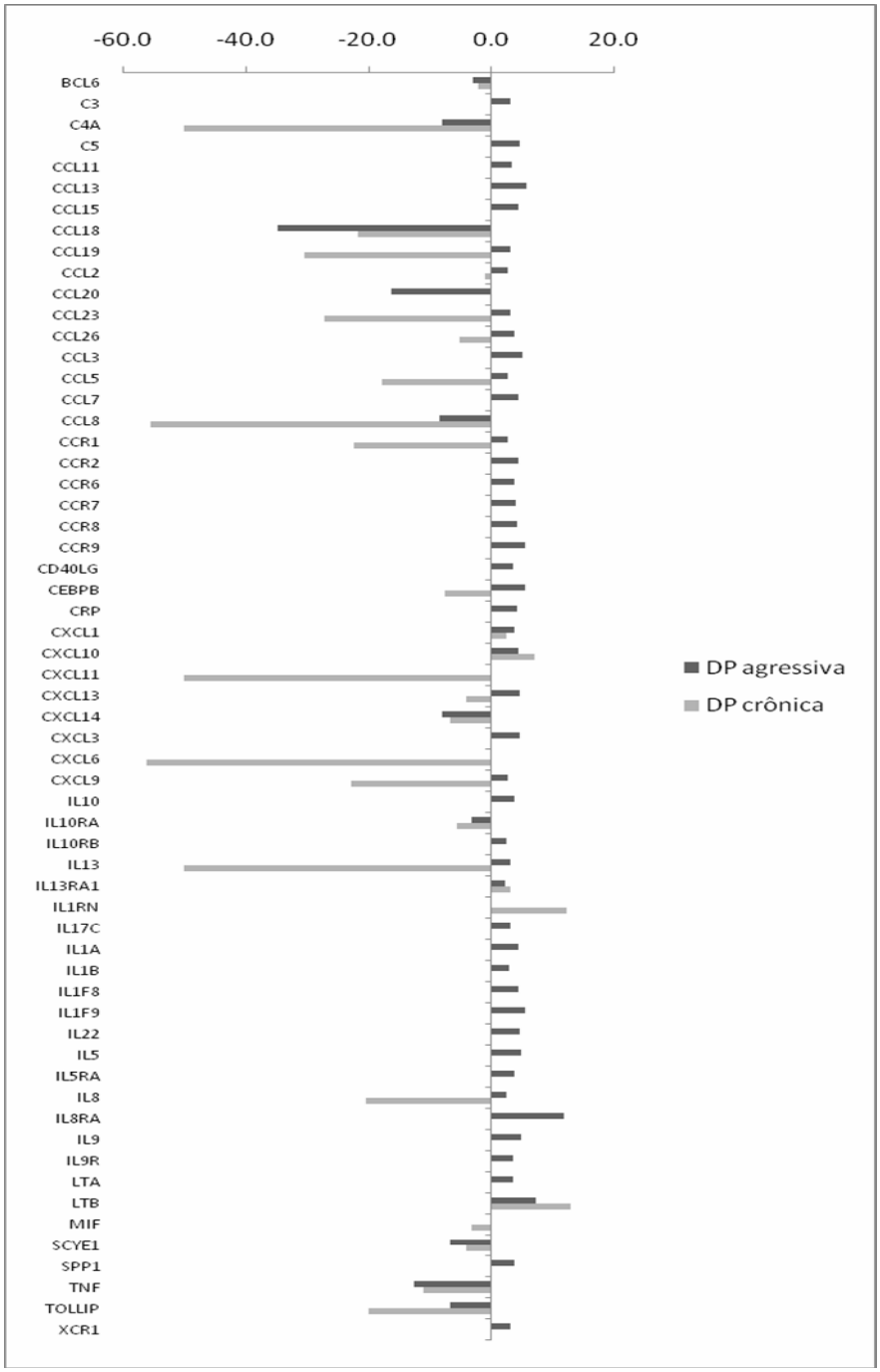

Figura 6 - Perfil de expressão gênica de sítios ativos da doença periodontal agressiva e crônica . O perfil de expressão gênica demonstra um padrão de resposta inflamatória diferente entre as doenças. A DP agressiva parece apresentar um padrão de genes com *up regulation* enquanto a DP crônica apresenta uma resposta com predomínio de genes *down regulated* .

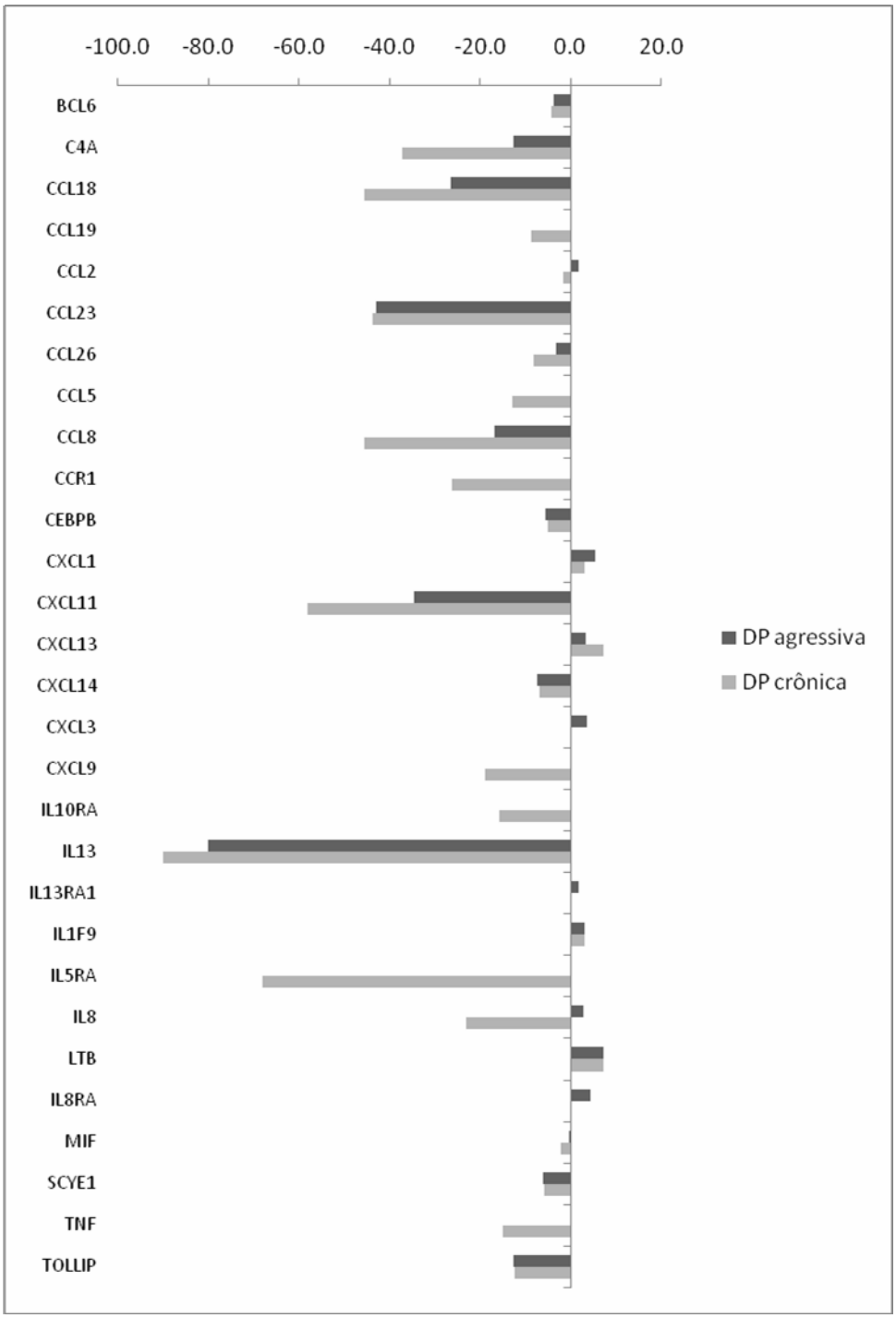

Figura 7- Perfil de expressão gênica dos sítios não ativos da doença periodontal agressiva e crônica. O perfil de expressão gênica demonstra um padrão semelhante de resposta inflamatória para ambas as condições da doença com uma tendência a baixa-regulação dos genes quando não há atividade.

Perfil da atividade dentro de cada grupo

Foram realizados a diferença do fold regulation dentro da DPA e DPC (figura 8)

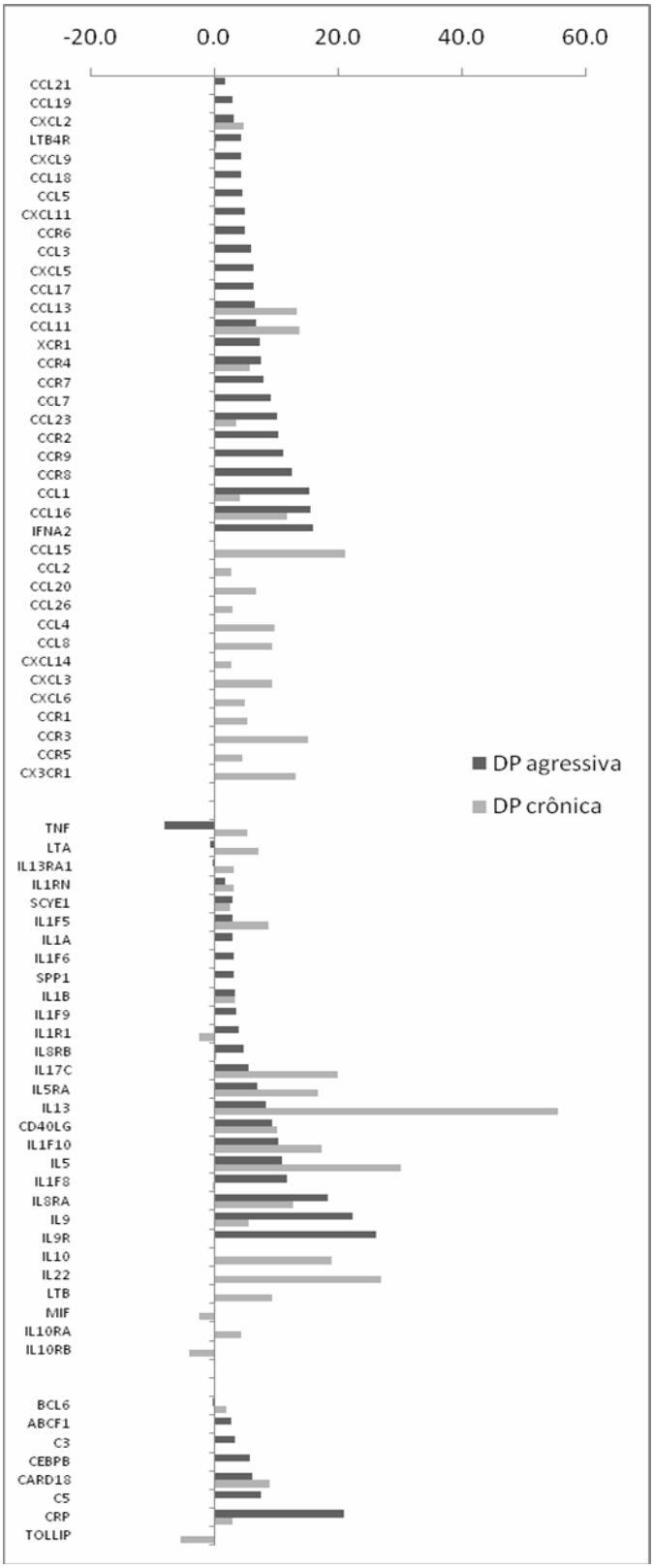

Figura 8 – Diferenças nos perfis de expressão gênica dos sítios ativos, em relação aos sítios não ativos, entre doença periodontal crônica e agressiva. As barras indicam o número de vezes que os sítios ativos estão *up* ou *down-regulated* em relação aos sítios não ativos

Os genes expressos em cada grupo de doença e atividade foram divididos em genes de quimiocinas, de citocinas, do complemento e outros genes envolvidos na resposta inflamatória conforme mostra a figura 9.

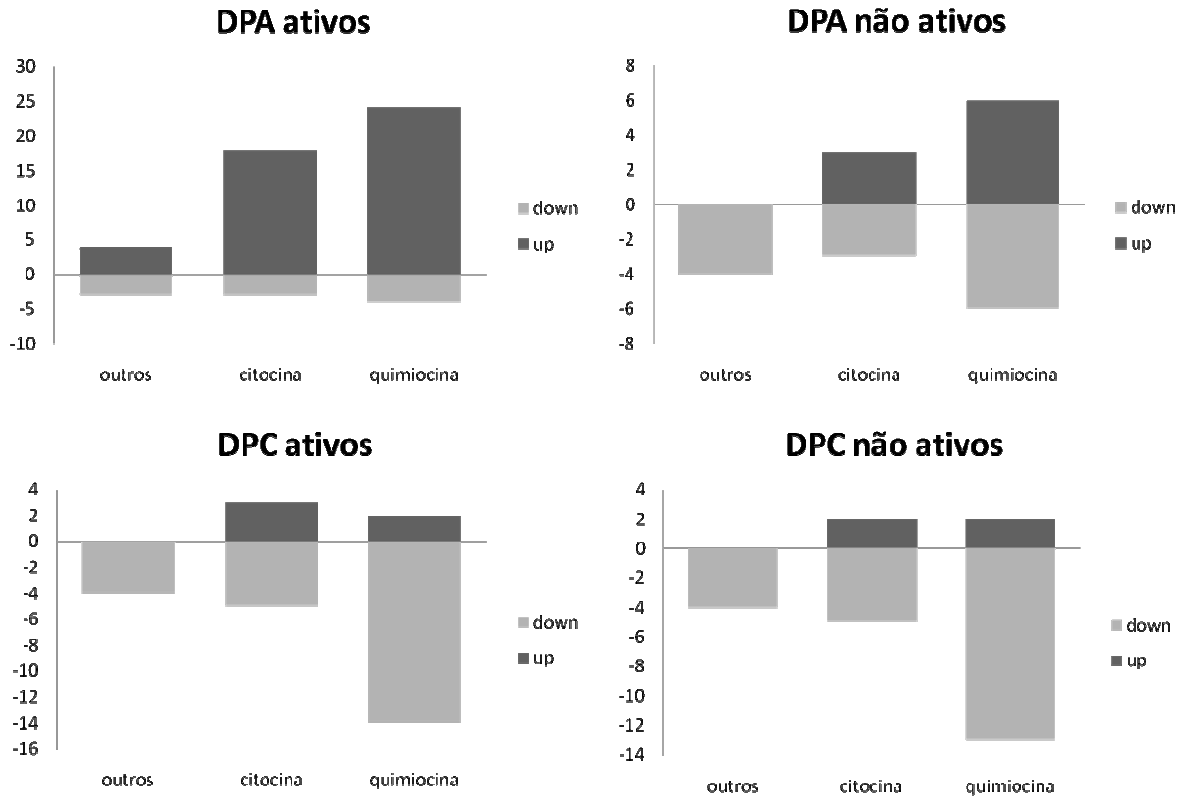

Figura 9- Diferenças nas categorias de genes expressos nos grupos DP agressiva e DP crônica. DPC Ativos = Doença Periodontal Crônica com atividade de doença; DPC Não ativos= Doença Periodontal Crônica sem atividade de doença; DPA Ativos= Doença Periodontal Agressiva com atividade de doença; DPA Não ativo= Doença Periodontal Agressiva sem atividade de doença; up= Maiores níveis de expressão (*up regulation*); down=menores níveis de expressão (*down regulation*).

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

No presente estudo foi analisada a expressão gênica de amostras de tecidos gengivais de indivíduos com doença periodontal (crônica e agressiva) e de indivíduos saudáveis, sem doença periodontal (controle). As amostras foram retiradas de sítios ativos e não ativos que foram monitorados em dois momentos: inicial e dois meses após o tratamento periodontal recomendado para cada condição, agressiva ou crônica. A parte clínica foi previsível e demonstrou melhoras significantes após o tratamento. Um detalhe interessante foi um número menor de sítios ativos após o uso de antibióticos pelos pacientes com doença periodontal agressiva.

Grande parte dos estudos (Kumar, Vamsi *et al.*, 2006; Cesar-Neto, Duarte *et al.*, 2007) em Periodontia seleciona números limitados de genes para um estudo detalhado e mais apropriado para análises aprofundadas de certos mecanismos. Entretanto, o PCR array nos oferece a oportunidade de uma busca mais abrangente, já que é possível analisar ao mesmo tempo 84 genes relacionados ao processo inflamatório. Através dessa análise mais abrangente foi possível identificar padrões distintos na DPA e DPC, bem como sinalizar potenciais genes, diferencialmente expressos, de interesse para estudos mais aprofundados sobre a susceptibilidade genética e marcadores previsores de risco de perda de inserção.

Em relação aos perfis de expressão gênica, os dois tipos de doença periodontal (DPA e DPC) apresentaram padrões distintos de resposta facilmente identificável. A doença periodontal agressiva apresentou uma quantidade maior de genes *up regulated,* enquanto que na doença periodontal crônica há um predomínio de genes *down regulated.* Isso confirma o fato das duas doenças serem

consideradas formas distintas de doença periodontal e reconhecidas pela Academia Americana de Periodontologia (Annalsofperiodontology, 1999). A doença periodontal agressiva apresenta um padrão de destruição mais severa e está relacionado com o tipo de resposta do hospedeiro (Guarnelli, Franceschetti *et al.*, 2008). Este predomínio de genes com maiores níveis de expressão *up regulated* indica maior influencia da resposta do hospedeiro, já que todos os genes existentes na placa de array e analisados neste estudo estão relacionados ao processo inflamatório.

Por outro lado, na doença periodontal crônica houve o predomínio de expressão de genes na forma *down regulated,* como visto na figura 5. Uma hipótese para esse resultado seria que, através de ativação e inibição de genes chaves, a doença apresenta um efeito imuno-regulatório para que a resposta tenha um padrão *"down-regulated"*.

A doença periodontal crônica apresentou um perfil gênico semelhante na atividade e não atividade de doença, com predomínio de genes *down regulated* após o tratamento básico periodontal. O estudo de Beikler et al (2008), apresenta metodologia semelhante à nossa, com remoção de amostras de sítios de indivíduos com DPC generalizada após seis a oito semanas do preparo básico periodontal. Foi realizada expressão gênica dessas amostras e eles puderam concluir que nos sítios com periodontite seguidos de tratamento básico a expressão de genes relacionados aos processos imunológicos e inflamatórios apresentavam-se *down regulated* em comparação ao grupo controle (Beikler, Peters *et al.*, 2008). Porém, não houve a divisão dos sítios em ativos e não ativos como no presente estudo, em que foi possível diferenciar a expressão gênica pela atividade de doença.

Diferentemente da doença periodontal crônica, esse estudo demonstrou que a doença periodontal agressiva apresenta um padrão de expressão gênica com

predomínio de *up-regulation* na presença de atividade de doença. Os sítios ativos apresentaram 82,1% dos genes *up regulated* enquanto nos sítios não ativos, o predomínio foi de genes down regulated (59,1%). O estudo de Sorensen et al 2008, comparou a expressão gênica de amostras de sangue de indivíduos com doença periodontal agressiva nas formas localizadas e generalizada com a de indivíduos controles. Nessa comparação 53 genes foram expressos de forma estatisticamente significante, sendo 52 *up regulated* e 1 *down regulated* (Sorensen, Havermose-Poulsen *et al.*, 2008). Esses genes estão envolvidos na resposta imune, respostas a estímulos externos, apoptoses, atividade de citocinas e quimiocinas e quimiotaxias. É interessante perceber o predomínio de *up regulation* da DPA em relação ao grupo controle. Contudo, o tipo de amostra utilizada não permite a comparação de atividade de doença como ocorre no presente estudo, onde amostras dos dois tipos de sítios são coletadas do mesmo indivíduo.

Clinicamente para que sítios periodontais possam ser considerados ativos devem apresentar perda de inserção de pelo menos 2 a 3 mm (Reddy, Geurs *et al.*, 2000; Hernandez, Valenzuela *et al.*, 2006). Essa grande variação é necessária para se evitar erros do tipo falso positivo, ou seja, quanto menor o limite de corte maior a chance de erros de classificação. A variação de 2 a 3 mm foi determinada pelo método de tolerância definido por Haffajee em 1983 (Haffajee, Socransky *et al.*, 1983) e significa 3 vezes o desvio-padrão ou “erro intrínseco” do método de sondagem manual (Reddy, Geurs *et al.*, 2000). Entretanto, neste trabalho a atividade da doença seguiu o método da tolerância preconizado por Haffajee em 1983 (Haffajee, Socransky *et al.*, 1983) modificado para sondagem computadorizada. Os sítios considerados ativos foram os que apresentaram perda de inserção ≥ 1 mm (considerando 3 vezes o desvio padrão da margem de erro de 0,3 mm da sonda

computadorizada) após o tratamento, aos dois meses do exame inicial. Os sítios não ativos foram definidos como aqueles com profundidade de sondagem equivalente aos sítios ativos, mas sem perda de inserção e sem sangramento à sondagem durante o mesmo período.

Houve uma melhora significante nos parâmetros clínicos de profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e índice de placa após o tratamento periodontal básico independente do grupo. Essa melhora geral está de acordo com a literatura, em que os parâmetros clínicos e microbiológicos melhoram de forma significativa após tratamento periodontal não cirúrgico (Serino, Rosling *et al.*, 2001).

Em relação à perda de inserção, cerca de 60% dos sítios obtiveram melhora, 10% permaneceram estáveis e 30% perderam inserção clínica. Resultados semelhantes foram alcançados por Jeffcoat e Reddy (1991) em um estudo que monitorou 30 pacientes com periodontite crônica por um período de 6 meses. As medidas do nível de inserção à sondagem foram realizadas nos períodos de 0, 2, 4 e 6 meses em cinco sítios localizados em dentes posteriores por paciente, por meio de uma sonda periodontal eletrônica. Os resultados demonstraram uma prevalência da atividade da doença dependente do limiar empregado na definição da perda de inserção à sondagem. A proporção de sítios ativos detectados com a utilização do limiar mais baixo (0,4mm) e mais alto (2,4mm) foi 29% e 2%, respectivamente (Jeffcoat e Reddy, 1991).

Conforme visto no trabalho existe uma diferença entre perda de inserção e atividade de doença. Atividade é uma análise feita em dados matemáticos de perda de inserção e está diretamente relacionada com o valor de limiar de corte. Ou seja, quanto maior o valor de corte, em mm, para que um sítio possa ser considerado ativo, menor essa quantidade e vice versa. No presente estudo cerca de 30% dos

sítios apresentaram perda de inserção, mas apenas 7,8% foram considerados ativos baseado no método de tolerância. E esse limiar de corte varia de acordo com a literatura (Haffajee, Socransky *et al.*, 1983; Reddy, Geurs *et al.*, 2000; Hernandez, Valenzuela *et al.*, 2006), o que dificulta uma comparação direta dos dados.

Na doença periodontal agressiva foi encontrada menor quantidade de sítios ativos que na DPC. Uma explicação para esse achado é o fato da DPA geralmente apresentar bolsas muito profundas nos sítios afetados pela doença, com maior tendência de melhora na inflamação e ganho de inserção após a raspagem. Outra explicação é o fato destes pacientes terem recebido tratamento adjunto de amoxilina e metronidazol. Era de se esperar que esse tipo de tratamento provocasse um quadro de atividade menor com eliminação do agente agressor/etiológico. De fato, foi alcançado em número de sítios ativos reduzidos em relação à DPC.

Ao compararmos o perfil de expressão entre as doença periodontais agressiva e crônica e o grupo controle sem doença periodontal, é possível perceber que a DPA, mesmo após o efeito adicional de antibióticos, ainda assim apresenta o quadro mais severo, com predomínio de genes *up regulated* nos sítios ativos, demonstrando a diferença em relação ao outro formato da doença. Além disso, o perfil gênico encontrado nas condições de DPC e DPA e sítios ativos e não ativos comprovaram que as doenças apresentam padrões inflamatórios distintos como visto nas figuras 6 e 7, caracterizando duas condições distintas (Annalsofperiodontology, 1999; Guarnelli, Franceschetti *et al.*, 2008). O critério de definição de atividade de doença, além de matemático, foi diferencialmente confirmado na figura 6, em que sítios não ativos têm um padrão semelhante nas duas doenças e sítios ativos um padrão *up regulated* na DPA, sugerindo que as lesões periodontais destrutivas ou “ativas” são sítios de risco que não responderam

igualmente ao tratamento convencional. Além disso, o perfil diferenciado de resposta sugere que doença progressiva não pode ser explicada somente devida a uma possível falha do tratamento em remover todo o cálculo aderido na superfície dental ou do controle inadequado do biofilme.

Os dados aqui obtidos são complexos, sinalizam genes de interesse e certamente permitem análises mais aprofundadas de potenciais genes chaves na resposta. Esses genes poderiam ser escolhidos para estudos como, por exemplo, de previsores da atividade da doença e determinantes de susceptibilidade. Assim, esse “screening” inicial dos perfis de expressão garante outros estudos mais aprofundados para confirmar e explicar o papel de cada gene ou grupo de genes envolvidos na atividade destrutiva das doenças periodontais.

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

As doenças periodontais agressiva e crônica são condições clínicas que apresentam diferenças na resposta imune e a atividade destrutiva da lesão periodontal ativa pode ser identificada por um padrão inflamatório *up-regulated* de resposta. Considerando as diferenças observadas, analises da susceptibilidade individual e abordagens terapêuticas personalizadas, capazes de modular a resposta, poderiam potencializar o efeito benéfico da terapia anti-infecciosa e reduzir o número de sítios ativos da doença periodontal progressiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Annalsofperiodontology. 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology, v.4 n.October 30-November 2, 1999, p.1-112.. 1999.

Arakawa, S., T. Nakajima, *et al.* Novel apoptosis-inducing activity in Bacteroides forsythus: a comparative study with three serotypes of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun, v.68, n.8, Aug, p.4611-5. 2000.

Aurer, A., A. Stavljenic-Rukavina, *et al.* [Markers of periodontal destruction in saliva of periodontitis patients]. Acta Med Croatica, v.59, n.2, p.117-22. 2005.

Beikler, T., U. Peters, *et al.* Gene expression in periodontal tissues following treatment. BMC Medical Genomics, v.1, n.30. 2008.

Berker, E., A. Kantarci, *et al.* Effect of neutrophil apoptosis on monocytic cytokine response to Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. J Periodontol, v.76, n.6, Jun, p.964-71. 2005.

Cesar-Neto, J. B., P. M. Duarte, *et al.* Smoking modulates interleukin-6:interleukin-10 and RANKL:osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. J Periodontal Res, v.42, n.2, Apr, p.184-91. 2007.

El-Awady, A. R., R. L. Messer, *et al.* Periodontal ligament fibroblasts sustain destructive immune modulators of chronic periodontitis. J Periodontol, v.81, n.9, Sep, p.1324-35. 2010.

Flemmig, T. F. Periodontitis. Ann Periodontol, v.4, n.1, Dec, p.32-8. 1999.

Garlet, G. P., W. Martins, Jr., *et al.* Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. J Periodontal Res, v.38, n.2, Apr, p.210-7. 2003.

Gilbert, G. H., B. J. Shelton, *et al.* Forty-eight-month periodontal attachment loss incidence in a population-based cohort study: role of baseline status, incident tooth loss, and specific behavioral factors. J Periodontol, v.76, n.7, Jul, p.1161-70. 2005.

Graves, D. T., Y. Jiang, *et al.* Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. Curr Opin Infect Dis, v.13, n.3, Jun, p.227-232. 2000.

Guarnelli, M. E., G. Franceschetti, *et al.* Adjunctive effect of chlorhexidine in ultrasonic instrumentation of aggressive periodontitis patients: a pilot study. J Clin Periodontol, v.35, n.4, Apr, p.333-41. 2008.

Guerrero, A., G. S. Griffiths, *et al.* Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. J Clin Periodontol, v.32, n.10, Oct, p.1096-107. 2005.

Haffajee, A. D., S. S. Socransky, *et al.* Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. J Clin Periodontol, v.10, n.3, May, p.298-310. 1983.

Hernandez, M., M. A. Valenzuela, *et al.* Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. J Periodontol, v.77, n.11, Nov, p.1863-70. 2006.

Ichinose, Y., N. Hara, *et al.* Recombinant granulocyte colony-stimulating factor and lipopolysaccharide maintain the phenotype of and superoxide anion generation by neutrophils. Infect Immun, v.58, n.6, Jun, p.1647-52. 1990.

Jeffcoat, M. K. e M. S. Reddy. Progression of probing attachment loss in adult periodontitis. J Periodontol, v.62, n.3, Mar, p.185-9. 1991.

Kabashima, H., M. Yoneda, *et al.* The presence of chemokine (MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, IP-10, RANTES)-positive cells and chemokine receptor (CCR5, CXCR3)-positive cells in inflamed human gingival tissues. Cytokine, v.20, n.2, Oct 21, p.70-7. 2002.

Kumar, M. S., G. Vamsi, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. J Periodontol, v.77, n.11, Nov, p.1803-8. 2006.

Kurtis, B., G. Tuter, *et al.* Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. J Periodontol, v.76, n.11, Nov, p.1849-55. 2005.

Loss, B. Systemic markers of inflammation in periodontitis. J Periodontol n.76(11 Suppl) p.2106-2115. 2005.

Offenbacher, S. Periodontal diseases: pathogenesis. Ann Periodontol, v.1, n.1, Nov, p.821-78. 1996.

Page, R. C., S. Offenbacher, *et al.* Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontol 2000, v.14, Jun, p.216-48. 1997.

Reddy, M. S., N. C. Geurs, *et al.* Periodontal disease progression. J Periodontol, v.71, n.10, Oct, p.1583-90. 2000.

Savarrio, L., M. Donati, *et al.* Interleukin-24, RANTES and CCR5 gene polymorphisms are not associated with chronic adult periodontitis. J Periodontal Res, v.42, n.2, Apr, p.152-8. 2007.

Serino, G., B. Rosling, *et al.* Initial outcome and long-term effect of surgical and non-surgical treatment of advanced periodontal disease. J Clin Periodontol, v.28, n.10, Oct, p.910-6. 2001.

Silva, T. A., G. P. Garlet, *et al.* Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. J Dent Res, v.86, n.4, Apr, p.306-19. 2007.

_____. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. Oral Microbiol Immunol, v.20, n.5, Oct, p.310-6. 2005.

Sorensen, L. K., A. Havermose-Poulsen, *et al.* Blood Cell Gene Expression Profiling in Subjects with Aggressive Periodontitis and Chronic Arthritis. J Periodontol, v.79, n.3, p.477-485. 2008.

Taba, M., Jr., J. Kinney, *et al.* Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. Dent Clin North Am, v.49, n.3, Jul, p.551-71, vi. 2005.

Van Winkelhoff, A. J., J. P. Rodenburg, *et al.* Metronidazole plus amoxycillin in the treatment of Actinobacillus actinomycetemcomitans associated periodontitis. J Clin Periodontol, v.16, n.2, Feb, p.128-31. 1989.

ANEXOS

ANEXO A: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/062/FORP

Ribeirão Preto, 22 de abril de 2008.

Senhor Professor,

Ref.: Processo nº 2008.1.168.58.0
CAAE nº 0015.0.138.000-08

A pedido da Profa. Dra. Simone Cecílio Hallak Regalo, Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 87ª Sessão, realizada no dia 17 de abril de 2008, deliberou **aprovar** o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos, intitulado: **"Expressão gênica relacionada à atividade da doença periodontal e seleção de potenciais biomarcadores diagnósticos",** a ser desenvolvido por Vossa Senhoria, na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, o **Relatório Parcial** no dia **30 de abril de 2009** e o **Relatório Final** no dia **30 de abril de 2010.**

Atenciosamente,

Glauce Della Rosa
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. MÁRIO TABA JÚNIOR
Professor Associado do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia – FORP/USP

GDR/gdr

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ANEXO B:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

Eu, _____, RG_____, CPF_____,fui convidado a participar da pesquisa "**Expressão Gênica Relacionada à Atividade da Doença Periodontal e Seleção de Potenciais Biomarcadores Diagnósticos**" sob responsabilidade do Prof. Dr. Mário Taba Jr e Ingrid Webb J. Ribeiro,e assino esse documento pois recebi todas as informações necessárias para tomar minha decisão de forma livre e espontânea. Estou ciente que recebi as seguintes informações:

Este estudo tem como objetivo comparar a gengiva de pessoas que tenham uma doença que leva a destruição de osso e inflamação na gengiva (doença periodontal) com a de pessoas saudáveis para essa doença. Isto será feito através de exames da gengiva, radiografias, coleta de saliva e da retirada de um tecido da gengiva. Este tecido somente será removido caso haja necessidade de alguma cirurgia periodontal para o tratamento da doença ou por motivo de estética relatado pelo paciente. Além disso, serão feitas perguntas sobre a saúde geral do paciente, que serão mantidas em sigilo profissional. O tratamento consiste na avaliação da gengiva através de uma sondagem ao redor dos dentes, de raspagem e profilaxia, para remoção de cálculos e placa bacteriana, coleta de saliva e se necessário, alguma cirurgia na gengiva. O desconforto será mínimo e pode ser causado durante os exames clínicos de rotina como a sondagem ou anestesia para a cirurgia. Não haverá dano à gengiva do paciente ou riscos previsíveis à saúde em geral. Com essa pesquisa buscamos detectar diferença na atividade da doença e a possibilidade de se criar um método de analise preventiva, através da saliva, do risco do individuo ser susceptível à doença periodontal.

O paciente não terá qualquer custo em relação ao tratamento proposto pelo dentista, já que os custos serão responsabilidade dos pesquisadores.

O paciente tem liberdade de se recusar a participar ou de se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem que isso cause algum prejuízo ao seu tratamento

O paciente tem o direito de sempre que se sentir em dúvida, pedir novos esclarecimentos, tanto antes, durante ou após a pesquisa

Fica claro que todos os dados obtidos e que foram relatados ao pesquisador são confidenciais e serão mantidos sigilosos.

Caso seja necessário algum contato, entrar em contato com 16-81153017 ou pelo e-mail iwjribeiro@gmail.com.

Ribeirão Preto, 21 de fevereiro de 2008,

_____

Prof. Dr. Mário Taba Júnior- CPF 070562408-01

_____

Ingrid Webb J. Ribeiro-CPF088600897-27

_____

Paciente ou Responsável

ARTIGO

Gene Expression Profile of Active Sites in Aggressive and Chronic Periodontal Disease Progression

Running title: Gene expression in periodontal disease;

Ingrid Webb Josephson Ribeiro [1],

Janine Montenegro Toscano Moura[1],

Priscila Paganini Costa[1],

Viviane Casagrande Mariguela[1]

Daniela Bazan Palioto [1],

Márcio Fernando de Moraes Grisi[1],

Sérgio Luís Scombatti de Souza[1],

Arthur Belém Novaes Júnior[1],

Mario Taba Júnior[1@]

[1] Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Phone number: 55 16 36024135. Fax number: 55 16 3602 4788

[@] Corresponding author: Mario Taba, Jr. Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: mtaba@usp.br

Key words: Gene expression, chronic periodontitis, Aggressive periodontitis, periodontal disease, chemokines, cytokines.

Conflict of Interest and Source of Funding: The authors declare no potential conflict of interest. This study was financially supported by FAPESP.

ABSTRACT

Aim: Evaluate the gene expression profile under healthy and periodontal disease conditions; identify possible differences in the gene expression profile between chronic and aggressive periodontal diseases; seek evidences of immune regulation differences in active and non active sites during periodontal destruction.

Methods: Clinical parameters of probing depth, relative attachment level, bleeding on probing and plaque index were obtained in two stages: initial and two months. The sites that showed attachment loss ≥1mm were considered active and others non-active. The gene expression profile of active and non-active sites, was obtained by gingival biopsies analysis with Real Time PCR Array.

Results: After non-surgical periodontal treatment, significant improvement in all clinical parameters were achieved ($P < 0.05$), except for the relative attachment level ($p > 0.05$). The disease showed different gene expression profiles with active sites showing a pattern significantly up-regulated compared to non-active sites.

Conclusion: Aggressive and Chronic Periodontitis are clinical conditions that showed differences in the immune response profile and that the progressive periodontal lesion can be recognized by an up-regulated inflammatory response. Considering the observed differences, it is possible that individualized therapeutic approaches that modulate the inflammatory response might enhance the efficacy of the anti-infective therapy and reduce active sites number after treatment.

Key-words: Gene expression, Chronic periodontitis, Aggressive periodontitis

Clinical Relevance

Scientific rationale for study and principal findings: Periodontal disease is an inflammatory disease that affects the periodontium and is the most cause of tooth loss in adults. The disease beginning is related to the presence of etiologic factors and host response, which can be innate or adaptive immune. Periodontal treatment is directly related to this host response, and still do not know exactly the gene expressed profile in disease and health clinical situations. Practical implications of this knowledge could enhance the beneficial effect of periodontal therapy and reduce disease activity.

INTRODUCTION

Periodontal disease is an inflammatory disease characterized by clinical attachment loss as well as bone loss around the teeth. Even though bacterial activity is clearly one of the causing agents for periodontitis, the complexity of the microfiber associated with the lesion and the way in which the host reacts to the bacterial attack renders the isolation of specific markers for this disease difficult (Taba, et al., 2005). Furthermore, the site-specific behavior of this disease complicates both the diagnostic process and the determination of proper therapies for the patient and the affected site.

In broad terms, the destruction of periodontal tissues might be triggered by the direct action of bacterial toxins or by the release of biological mediators from the activated defense cells (Taba, Kinney, Kim, & Giannobile, 2005). Locally, bacterial lipopolysaccharides (LPS) induce monocytes, polymorphonuclear leucocytes, neutrophils, macrophages among other cells to release interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF) and prostaglandin E (PGE_2), meaning that IL-1 and TNF seem to act in the destruction of tissues and PGE_2 in bone loss, associated with periodontitis (Aurer, Stavljenic-Rukavina, & Aurer-Kozelj, 2005; Loss, 2005; Taba, Kinney, Kim, & Giannobile, 2005). LPS also induces apoptosis in defense cells (Ichinose, et al., 1990). In this process, neutrophil apoptosis signals monocytes to modify their phenotype, thus producing anti-inflammatory cytokines and suppressing post-inflammatory cytokines (Berker, et al., 2005). This way, the apoptosis process seems to play an important role in periodontitis (Arakawa, et al., 2000; Graves, Jiang, & Genco, 2000), even though the specific molecular mechanisms for this process still remain obscured.

Chemokines, important chemicals for leukocyte migration and activation in different inflammatory diseases, have not all been characterized in periodontitis. However, the expression of receptors CCR1, CCR5 CXCR3, CCR2 and CCR3 suggest the concurrent occurrence of Th1 and Th2 type responses, and RANTES chemokines, IP-10 and MCP-1

might indicate alterations in the phase of the disease (Silva, et al., 2005). MIP-1α and IP-10 chemokines and their receptors CCR5 and CXCR3 are related to periodontitis, more frequently appearing in aggressive periodontitis (Kabashima, et al., 2002; Savarrio, et al., 2007). The expression of MCP-1 is slightly higher in patients exhibiting chronic periodontitis, despite the inexistence of statistically significant differences when compared with aggressive periodontitis (Kurtis, et al., 2005).

The different chemokines and cytokines involved in the immunopathogenesis of periodontal diseases direct the migration and maintenance of the many cellular types, such as polymorphonuclear leucocytes, NK cells (Natural Killer), dendritic cells, macrophages and lymphocytes within gingival tissue. These cells participate in the immunological and inflammatory reactions aimed at expunging the pathogen, presenting antigens and at the production of more cytokines in the designated site, determining or not the progression of the disease (Garlet, et al., 2003).

Many proteins associated with natural bio-fluids such as blood, serum, plasma, saliva or solubilized preparations for biopsies can be linked to biological processes of clinical importance. Thus, in scientific literature, one may find studies such as the one carried out by Kumar et al. (2006) in which gingival biopsies were utilized to evaluate the expression of matrix metalloproteinase (MMP) -8 and -9 in patients exhibiting chronic periodontitis with or without mellitus diabetes using the Western blotting method. César-Neto et al. (Cesar-Neto, et al., 2007) have also used gingival biopsies to evaluate the effect of smoking in the interleukin (IL) genes-1α, 1ra, -6, -8 and -10, tumor necrosis factor- α, MMP -2 and -8, Receptor Activator for Nuclear Factor κB Ligand (RANKL) and osteoprotegerin in sites where periodontitis was present.

As briefly described above, the immune pathogenesis of the periodontal disease is a very complex mechanism where the biological processes that drive the response towards the

resolution or destruction are affected by a variety of risk factors. Even though the risk factors are always present the host response seems to have a major role in the disease activity.

Therefore, the aims of this study were to (i) evaluate the gene expression profile under healthy and periodontal disease conditions by gene expression analysis; (ii) identify possible differences in the gene expression profile between chronic and aggressive periodontal diseases; (iii) seek evidences of immunoregulation differences in active and non active sites during periodontal destruction.

MATERIAL AND METHODS

Study subjects:

A total of 54 patients were selected; amongst which 25 presented chronic periodontitis (CP), 18 aggressive periodontitis (AgP) and 11 were healthy (control group). The patients were chosen from the dental clinics of the Ribeirão Preto School of Dentistry and were invited to take part in the study. All enrolled subjects gave written consent on a form aproved by the Ethics Committee Protocol of the Ribeirão Preto School of Dentistry - USP (approval number #2007.1.168.58.0)

As inclusion criteria, the patients should have at least 14 natural teeth, 10 of which should be posterior teeth. The patients presenting chronic periodontitis should be at least 35 years old and exhibit 5 teeth with a probing depth (PD) of ≥ 5 mm and clinical attachment loss of ≥ 3 mm (Hernandez et al., 2006). Patients who presented aggressive periodontitis should be no younger than 18 and no older that 35 and have 5 teeth with a PD ≥ 5 mm and clinical attachment loss of ≥ 3 mm, without direct relation with etiological factors that could be clinically detectable. Patients from the control group should present PD ≥ 3 mm in all teeth and plaque index and bleeding on probing values should be ≤ 20%, with some aesthetic surgeries needed.

Exclusion criteria included history of smoking, pregnancy, presence of chronic inflammatory conditions or immunologic compromise, such as arthritis and gastrointestinal disorder or continuous use of anti-inflammatory medication, antibiotics, immunosuppressive or anticoagulants. Also, could not have received periodontal treatment in the six months ago.

Periodontal therapy:

The following parameters were evaluated in 6 sites per tooth: Plaque index (PI), probing depths (PD), bleeding on probing (BOP) and relative clinical attachment levels (rCAL).

Patients received root planning and scaling periodontal treatment. Root scaling was performed in an interval of up to 48 h with ultra-sound[*] points and Gracey[†] curettes after local anesthesia when subgingival scaling was necessary. The patients returned a week later for new oral hygiene instruction, and to begin biofilm control process through monthly prophylaxis.

Patients presenting aggressive periodontal disease underwent antibiotic therapy with 500 mg amoxicillin three times a day and 400 mg Metronidazole twice a day for 10 days, starting a day before the first mechanical instrumentation session (Guerrero, et al., 2005; van Winkelhoff, et al., 1989).

Disease activity:

Disease activity diagnostics was adapted on a tolerance method (Haffajee, Socransky, & Goodson, 1983). Active Sites were those which presented clinical attachment loss of ≥ 1 mm (considering the standard deviation of 0.3 mm for the electronic probe multiplied by 3) two months after initial clinical examination. Sites were considered inactive if presenting a PD equivalent to those of the active ones, but without any clinical attachment loss during the same period.

[*] Cavitron, Dentsply Cavitron, Long Island, NY, USA
[†] Hu-Friedy instruments, Chigago, IL, USA.

So, after two months, new periodontal examination was done to evaluate PI, BOP, PD and rCAL using a computerized probe to detect actively compromised sites.

Gingival biopsy

Gingival tissue samples (epithelial and connective tissues) were removed from an active and non active site from the same patient and from a healthy area to control group. This sample are immediately submerged into liquid nitrogen to be then preserved under -80ºC for posterior RNA extraction and gene expression analysis.

RNA extraction

RNA from the samples was extracted using a total RNA separating reagent[‡] and purified[§], following manufacturer's instructions. RNA was submitted to electrophoresis in denaturizing gel (2% agarose containing 2.2M of formaldehyde and 1X MOPS buffer) for integrity verification. The extracted material was then quantified and stored under -80ºC.

cDNA Synthesis

From 1 µg of total RNA a strand of cDNA was made by reverse transcription[**]. Initially, 2 µl of GE (5X gDNA Elimination Buffer) were added to the RNA sample and the final reaction volume was adjusted to 10 µl with RNase-free water. The sample was submitted to thermocycling at 42ºC for 15 minutes and immediately added to a sample of a mixture containing: 4 µl of BC3 buffer (5X RT Buffer 3), 1 µl of P2 (Primer and External Control Mix), 2 µl of RE3 (RT Enzyme Mix 3) and 3 µl of RNase-free water, which was heated to 95ºC for 5 minutes. At the end of this reaction, cDNA was diluted with 91 µl of water and stored at -20ºC for later use.

[‡] Trizol, Invitrogen, Milan, Italy
[§] ArrayGrade™ Total RNA Isolation Kit – SABiosciences
[**] RT^2 First Strand Kit - SABioscience (cod C03)

Real-time PCR array

The PCR array system combined the quantitative performance of real time PCR with the multiple gene profiling capabilities of the array. Real time PCR array allowed simultaneous analysis of 84 genes involved in specific signaling pathways, without mentioning the use of 5 different endogenous control systems, granting higher sensibility and specificity, as well as high reproductiveness of results. In this study 50 PCR array plates for human inflammatory cytokines and receptors were used were used for PCR array replacement of track and human inflammatory cytokines.[††]

The genes that comprise the inflammatory pathway and cytokine PCR array are described below:

Chemokine gene:

CCL1 (I-309), CCL11 (eotaxin), CCL13 (mcp-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL2 (mcp-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2 / eotaxin-2), CCL25 (TECK) , CCL26, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (mcp-3), CCL8 (mcp-2), CXCL1, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC / IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL2, CXCL3, CXCL5 (ENA-78 / LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9, IL8, CCL13 (mcp-4)

Chemokine receptor:

CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1, IL8RA, XCR1 (CCXCR1)

Cytokine gene:

CD40LG (TNFSF5), IL10, IL13, IL17C, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL22, IL5, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, SCYE1, SPP1, TNF, IFNA2

[††] Human Inflammatory Cytokines & Receptors (PAHS-011) - PCR Array SuperArray®- SABiosciences

cytokine receptor:

IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RA1, IL5RA, IL9R, IL1R1, IL1RN, IL8RB, LTB4R

Other genes involved in inflammatory response:

ABCF1, ICEBERG (CARD18),BCL6, C3, C4A, CEBPB, CRP, C5, TOLLI

The reactions were carried out in duplicates for each tissue sample (active site, non-active site and control). For each PCR reaction in real time we used: 1350 µl of buffer [‡‡]; 102 µl of cDNA synthesis reaction diluted; 1248 µl of RNAse free water. 25 µl to this mixture were added in each well of 96-well plate already containing lyophilized primer pairs for inflammatory pathway and cytokines. Then, the reaction was performed on a real-time thermocycler[§§] . Conditions of real time PCR were as follows: 10 minutes at 95°C (activate the HotStart DNA polymerase) and 40 cycles for amplification for 15 sec at 95°C (denaturation), 30 to 40 sec at 55°C (annealing) and 30 sec at 72°C (extension).

Following sample amplification, differential expression calculation was done by RT^2 Profiler PCR Array Data Analysis (SuperArray-SABiosciences) - Attachment 2. Genes that present threshold cycles (TC) higher than 30 were considered not expressed. Relative gene expression normalization and quantification was performed by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak et al., 2001). This way, data were presented as a difference (in X times) in gene expression, which will be normalized by the geometric mean value of 5 genes from the endogenous control (B2M, HPRT1, RPL13A, GADPH, ACTB). The significance level was $p \leq 0,05$.

[‡‡] 2X SuperArray RT^2 qPCR Master Mix (SyberGreen
[§§] Bio-Rad: Opticon, Opticon 2, Chromo 4 (MJ Research). Takara:TP-800. Sabioscience

Statistical analysis

Clinical parameters:

Data were registered as their respective standard deviation mean value for clinical parameters. Specific sites and individuals were considered for the non-parametric statistical analysis. For intra-group comparison, before and after treatment, Wilcoxon test was applied and for the intergroup analysis Mann-Whitney test was used. A significance level of 5% was adopted for all statistical analyses ($P<0,05$).

Real Time PCR arrays:

Statistical analyses were performed using web-based analyses software. This software performed all ΔΔCt-based fold-change calculations from uploaded raw Ct data. This software also performed pair-wise comparisons among groups of experimental replicates and defined fold-change and statistical significant thresholds. Comparison of fold regulation is considered significant if $p<0.05$.

RESULTS

From the 54 selected patients 12 of them did not return for reevaluation after 2 months. Thus, the final sample was composed of 42 subjects; 15 (AgP), 17 (CP) and 10 (control group). Demographics data are displayed in table 1**.** The clinical parameters, such as probing depth, clinical attachment level, bleeding on probing and plaque index, were analyzed at two different times: at the beginning and at the reevaluation.

Initial parameters in intergroup analysis (AgP X CP) showed a statistically significant difference between the periodontal disease groups for the initial clinical parameters of bleeding on probing and plaque index. The plaque index showed lower initial group of AgP ($p = 0.009$) and the rate of bleeding was lower for the CP ($p = 0.026$). (Table 1)

Statistical analysis showed that non-surgical periodontal treatment lead to significant reductions in the following parameters: probing depth, bleeding on probing and plaque index; for both groups of periodontal disease (AgP, CP). The 5112 sites were monitored and classified by disease activity in active or non active sites, which there was a greater number of active sites in the CP (p=0,009).(table 1). Disease activity was separated according bleeding on probing, such as found in figure 1.

Regarding clinical attachment level, in millimeters, among the evaluated sites, improvement in this parameter was evident in 59.6% of the cases; in 10.3% it remained stable, and there was clinical attachment loss in 30.1% of the cases. Of the latter 26% had loss of attachment ≥ 1 mm, being considered as active sites

Gene Expression analysis:

The gene expression results in groups of patients with aggressive periodontitis and chronic (active and non active sites) was given by the number of times (fold) that showed increased expression (up regulation) or decreased (down-regulation) compared to control patients. We considered only genes that showed expression level of significance $p < 0.05$. The results are presented in tables and figures for each study group to better view of it.

In aggressive periodontal disease group, the active sites tested, when compared to control showed 56 (66.7%) differentially expressed genes as shown in Table 2. Of these, 46 (82.1%) were up regulated and 10 (17.9%) down regulated. The non active sites tested, when compared to control group showed 22 (26.2%) differentially expressed genes as shown in Table 3. Of these, nine (40.9%) were up regulated and 13 (59.1%) down regulated. Besides the active and non active sites expression compared to control group we also compared the expression levels between the two sites (Figure 2).

In chronic periodontal disease, the active sites of chronic periodontitis patients examined, compared to control patients showed 28 (33.3%) differentially expressed genes as shown in Table 4. Of these, five (17.9%) were up regulated and 23 (82.1%) down regulated. Non active sites tested, when compared to control group showed 26 (31%) differentially expressed genes as shown in Table 5. Of these, four (15.4%) were up regulated and 22 (84.6%) down regulated. Were compared active sites and inactive sites within the CPD and he gene expression profile is Figure 3.

The Gene expression profiles between CP and AgP for active and non-active sites are shown respectively in figure 4 and figure 5. The analysis of the difference of fold regulation within the DPA and DPC is shown in Figure 6.

The genes expressed in each disease group and activity were divided in genes of chemokines, cytokines, complement and other genes involved in inflammatory response as shown in figure 7.

DISCUSSION

In this study we analyzed the gene expression of gingival tissue samples from patients with periodontal disease (chronic and aggressive) and compared to samples of the control group, healthy for periodontal disease. These samples were taken from sites that were analyzed in two stages: initial and two months after basic periodontal treatment. Results showed gene expression different pattern between the two kinds of periodontal disease when compared with the control group as can be seen in the figures that show the active and not active genes expression compared with control group. When comparing the two types of disease is possible to realize that aggressive periodontitis has a larger number of genes up regulated and in chronic periodontal disease there is a predominance of genes down regulated.

This confirms the fact that both diseases are considered different forms of periodontal disease by the American Academy of Periodontology (AnnalsofPeriodontology, 1999). Aggressive periodontal disease has a pattern of destruction more severe and associated with host response (Guarnelli, et al., 2008). This predominance of genes with higher expression levels present in this form of disease may be related to this, since all genes in the array plate analyzed in this study are related to the inflammatory process.

In chronic periodontal disease there is a predominance of gene expression down regulated as seen in Figure 5 and a hypothesis for this result would be that, somehow, the disease suffers a regulatory effect of the host, so that genes remain down-regulated.

Most periodontal studies (Cesar-Neto, Duarte, de Oliveira, Tambeli, Sallum, & Nociti, 2007; Kumar, et al., 2006) select limited numbers of genes for a more detailed study, but the PCR array offers us the opportunity of a search beyond those already known genes, since it is possible analyse in one time 84 genes related to inflammation.

In our study, the CP showed a gene profile similar in activity and no activity disease, with a predominance of genes down regulated after basic periodontal treatment. The study of Beikler et al (Beikler, et al., 2008), presents a similar methodology, with samples from sites of subjects with CP generalized after six to eight weeks of basic periodontal treatment. Gene expression of these samples was made and they conclude that in sites with periodontitis followed by basic treatment the expression of genes related to immune and inflammatory processes had to be down regulated in comparison to the control group. But there was no sites division into active and non-active as in the present study.

Our study found a pattern of gene expression with predominant up-regulation in aggressive disease group when we analyzed the activity of disease. The active sites had 82.1% of genes up regulated, while in non active sites the prevalence was down regulated genes

(59.1%). The study by Sorensen et al (Sorensen, et al., 2008), compared the blood cell gene expression in subjects with aggressive periodontitis to healthy controls. In this comparison 53 genes were differentially expressed, being 52 up regulated and one down regulated. These genes are involved in immune response, external stimulus response, apoptosis, cytokines and chemokines activity and chemotaxis. It is interesting to note the up regulation predominance in AgP compared to control group. However, the kind of sample used does not allow the comparison of disease activity as in the present study, where samples of both types of sites are collected from the same individual.

Clinically, for periodontal sites can be considered active they must have clinical attachment loss of at least 2 to 3 mm (Hernandez, et al., 2006; Reddy, et al., 2000). This quite large interval is made necessary to avoid false positives, in other words, the smaller the threshold, higher the change of classification errors. The variation from 2 to 3 mm was determined by the tolerance method defined by Haffajee em 1983 (Haffajee, Socransky, & Goodson, 1983) and it uses the standard deviation value from the manual probing method (Reddy, Geurs, Jeffcoat, Proskin, & Jeffcoat, 2000) multiplied by 3 or "intrinsic error". However, this study disease activity followed the method recommended by Haffajee tolerance in 1983 (Haffajee, Socransky, & Goodson, 1983) modified for electronic probing. The sites that were considered active were the ones showing clinical attachment loss of ≥1 mm (considering the error margin's standard deviation value from the electronic probe of 0.3 mm multiplied by 3) following 2 months post-initial examination. Inactive sites were defined as being those with a probing depth equivalent to that of active sites, but with no clinical attachment loss during the same period.

There have been significant improvements in the following clinical parameters: probing depth, bleeding on probing and plaque index following basic periodontal treatment, regardless of the group. This overall improvement corroborates with the ongoing scientific

literature, in which the clinical and microbiological parameters improved significantly after periodontal treatment nonsurgical (Serino, et al., 2001).

Concerning clinical attachment loss, around 60% of sites had considerable improvement, 10% remained stable and 30% presented clinical attachment loss. Similar results were obtained by Jeffcoat e Reddy in 1991 (Jeffcoat & Reddy, 1991) in a study which monitored 30 patients with chronic periodontitis for a period of 6 months. Clinical attachment levels were probed in the periods of 0, 2, 4 and 6 months in five sites located in posterior teeth, through an electronic periodontal probe. Results showed a prevalence of disease activity depending on the threshold employed in the definition of clinical attachment loss on probing. The percentage of detected active sites when using the lower (0.4 mm) and higher thresholds (2.4 mm) was 29% and 2%, respectively (Jeffcoat & Reddy, 1991).

As seen in the present study, there is a considerable difference between clinical attachment loss and disease activity. Activity analysis is made using mathematical data from measured attachment loss and it is directly related to the chosen threshold limit. In other words, the higher the threshold in *mm* for a site to be considered active, the less active sites number it will have. In the present study, around 30% of all sites presented clinical attachment loss, but only 7.8% were considered active based on the tolerance method. This threshold varies according to the literature (Haffajee, Socransky, & Goodson, 1983; Hernandez, Valenzuela, Lopez-Otin, Alvarez, Lopez, Vernal, & Gamonal, 2006; Reddy, Geurs, Jeffcoat, Proskin, & Jeffcoat, 2000), which makes it difficult to establish a direct comparison.

In this study we found fewer active sites in AgP than in the CP. One explanation for this finding is that the AgP generally presents very deep in affected sites by the disease, with a trend of improvement in inflammation and attachment gain after scaling and root planning. Other explanation is that these subjects had received adjunctive treatment of amoxicillin and

metronidazole. It was expected that such treatment results in a smaller disease activity with elimination of the etiology/aggressor agent. In fact it was achieved a reduced number of active sites in relation to the CP.

When comparing the expression profile between AgP, CP and control, we can see that the AgP still has the most severe clinical situation, with a predominance of up regulated genes in active sites, demonstrating the difference with another form of the disease. Moreover, the gene profile found in CP and AgP conditions and non-active and active sites showed that the inflammatory diseases have distinct patterns as seen in Figures 6 and 7, featuring two different conditions (AnnalsofPeriodontology, 1999). The criterion for defining disease activity, besides mathematical, was differentially confirmed in Figure 6, where non active sites have a similar pattern in both diseases and differ from active sites in AgP that have an up regulated pattern, suggesting that destructive periodontal lesions or active are risk sites that not responding to conventional treatment and not just a possible treatment failure

CONCLUSION

AgP and CP are clinical conditions that differ in immune response and destructive activity of the active periodontal lesion can be identified by a standard up-regulated inflammatory response. Considering the differences, individualized therapeutic approaches that modulate the response could enhance the beneficial effect of anti-infective therapy and reduce the number of active sites.

The periodontal disease activity recognition paves the way for response modulate therapies that can potentiate benefits beyond the anti-infective therapy.

Acknowledgments: The study had the financial support of the Foundation for Research Support of São Paulo grant 2007/08424-3. Authors thank the kind assistance of Fabíola Singaretti de Oliveira, Glauce Trevisan and Natalia Torres from the Molecular Biology Laboratory of the University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Dentistry, Department of Oral Surgery and Periodontology,

REFERENCES

AnnalsofPeriodontology (1999). 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Papers. Oak Brook, Illinois, Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*, **4**: 1-112.

Arakawa, S., Nakajima, T., Ishikura, H., Ichinose, S., Ishikawa, I. & Tsuchida, N. (2000). Novel apoptosis-inducing activity in Bacteroides forsythus: a comparative study with three serotypes of Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Infect Immun*, **68**, 4611-4615.

Aurer, A., Stavljenic-Rukavina, A. & Aurer-Kozelj, J. (2005). [Markers of periodontal destruction in saliva of periodontitis patients]. *Acta Med Croatica*, **59**, 117-122.

Beikler, T., Peters, U., Prior, K., Eisenacher, M. & Flemming, T. F. (2008). Gene expression in periodontal tissues following treatment. *BMC Medical Genomics*, **1**.

Berker, E., Kantarci, A., Hasturk, H. & Van Dyke, T. E. (2005). Effect of neutrophil apoptosis on monocytic cytokine response to Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. *J Periodontol*, **76**, 964-971.

Cesar-Neto, J. B., Duarte, P. M., de Oliveira, M. C., Tambeli, C. H., Sallum, E. A. & Nociti, F. H., Jr. (2007). Smoking modulates interleukin-6:interleukin-10 and RANKL:osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. *J Periodontal Res*, **42**, 184-191.

Garlet, G. P., Martins, W., Jr., Ferreira, B. R., Milanezi, C. M. & Silva, J. S. (2003). Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res*, **38**, 210-217.

Graves, D. T., Jiang, Y. & Genco, C. (2000). Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. *Curr Opin Infect Dis*, **13**, 227-232.

Guarnelli, M. E., Franceschetti, G., Manfrini, R. & Trombelli, L. (2008). Adjunctive effect of chlorhexidine in ultrasonic instrumentation of aggressive periodontitis patients: a pilot study. *J Clin Periodontol*, **35**, 333-341.

Guerrero, A., Griffiths, G. S., Nibali, L., Suvan, J., Moles, D. R., Laurell, L. & Tonetti, M. S. (2005). Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of

generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, **32**, 1096-1107.

Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Goodson, J. M. (1983). Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol*, **10**, 298-310.

Hernandez, M., Valenzuela, M. A., Lopez-Otin, C., Alvarez, J., Lopez, J. M., Vernal, R. & Gamonal, J. (2006). Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol*, **77**, 1863-1870.

Ichinose, Y., Hara, N., Ohta, M., Aso, H., Chikama, H., Kawasaki, M., Kubota, I., Shimizu, T. & Yagawa, K. (1990). Recombinant granulocyte colony-stimulating factor and lipopolysaccharide maintain the phenotype of and superoxide anion generation by neutrophils. *Infect Immun*, **58**, 1647-1652.

Jeffcoat, M. K. & Reddy, M. S. (1991). Progression of probing attachment loss in adult periodontitis. *J Periodontol*, **62**, 185-189.

Kabashima, H., Yoneda, M., Nagata, K., Hirofuji, T. & Maeda, K. (2002). The presence of chemokine (MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, IP-10, RANTES)-positive cells and chemokine receptor (CCR5, CXCR3)-positive cells in inflamed human gingival tissues. *Cytokine*, **20**, 70-77.

Kumar, M. S., Vamsi, G., Sripriya, R. & Sehgal, P. K. (2006). Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol*, **77**, 1803-1808.

Kurtis, B., Tuter, G., Serdar, M., Akdemir, P., Uygur, C., Firatli, E. & Bal, B. (2005). Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol*, **76**, 1849-1855.

Loss, B. (2005). Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 2106-2115

Reddy, M. S., Geurs, N. C., Jeffcoat, R. L., Proskin, H. & Jeffcoat, M. K. (2000). Periodontal disease progression. *J Periodontol*, **71**, 1583-1590.

Savarrio, L., Donati, M., Carr, C., Kinane, D. F. & Berglundh, T. (2007). Interleukin-24, RANTES and CCR5 gene polymorphisms are not associated with chronic adult periodontitis. *J Periodontal Res*, **42**, 152-158.

Serino, G., Rosling, B., Ramberg, P., Socransky, S. S. & Lindhe, J. (2001). Initial outcome and long-term effect of surgical and non-surgical treatment of advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol*, **28**, 910-916.

Silva, T. A., Garlet, G. P., Lara, V. S., Martins, W., Jr., Silva, J. S. & Cunha, F. Q. (2005). Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol*, **20**, 310-316.

Sorensen, L. K., Havermose-Poulsen, A., Sonder, S. U., Bendtzen, K. & Holmstrup, P. (2008). Blood Cell Gene Expression Profiling in Subjects with Aggressive Periodontitis and Chronic Arthritis. *J Periodontol*, **79**, 477-485.

Taba, M., Jr., Kinney, J., Kim, A. S. & Giannobile, W. V. (2005). Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am*, **49**, 551-571, vi.

van Winkelhoff, A. J., Rodenburg, J. P., Goene, R. J., Abbas, F., Winkel, E. G. & de Graaff, J. (1989). Metronidazole plus amoxycillin in the treatment of Actinobacillus actinomycetemcomitans associated periodontitis. *J Clin Periodontol*, **16**, 128-131.

Figure Legends:

Figure 1 - Activity of periodontal disease and bleeding on probing percentage. Active sites = CAL ≥ 1mm after 2meses; Non- active= sites without attachment loss after 2meses.

Figure 2 – Comparison of gene expression profile of active and non-active sites of AgP group. The bars located on the positive axis shows up regulated genes and bars located on the negative side of the axis correspond to genes with down-regulation.

Figure 3 – Comparison of gene expression profile of active and non-active sites of CP group. The bars located on the positive axis shows up regulated genes and bars located on the negative side of the axis correspond to genes with down-regulation.

Figure 4 – Gene expression profile of active sites for Aggressive (AgP) and Chronic Periodontitis (CP). The gene expression profile demonstrates a different pattern of inflammatory response. AgP group seems to have a bulky inflammatory response in contrast to a more down-regulated response of the CP group.

Figure 5 – Gene expression profile of non-active sites for Aggressive (AgP) and Chronic Periodontitis (CP). The gene expression profile demonstrates a similar pattern of inflammatory response for both disease conditions with a down-regulation trend of the genes.The non-active sites showed a reduced number of genes up- or down-regulated in comparison to the active sites.

Figure 6 – Differences of gene expression profile between AgP and CP. The bars indicate the number of times that the active sites are up or down-regulated compared to non active sites.

Figure 7 - Genes expressed classification in the groups of PD and disease activity. DPC Active = Chronic Periodontal Disease with disease activity; DPC Non-active = Chronic Periodontal Disease without disease activity, DPA active = Aggressive Periodontal Disease with disease activity; DPA non active= Aggressive Periodontal Disease with no disease activity; up = up regulation, down = down regulation.

TABLES AND FIGURES

Table 1 – Demographics and periodontal status

	Control	CP	AgP	p-value (CP vs AgP)
Subjects (n)	10	17	15	
Gender (m/f)	1/9	6/11	4/11	
Race (c/nc)	10	15/2	10/5	
Age (mean±sd)	29.3±3.6	44.1±6.4	30.9±3.9	
PD mm (mean±sd)	1.86±0.21	2.45±0.42	2.65±0.47	0.169
baseline				
PD mm (mean±sd)	nd	2.08±0.37	2.11±0.35	0.842
2 months				
		p<0.001	p<0.001	
rCAL mm(mean±sd)	8±0.24	9.45±1.37	9.45±1.17	0.914
baseline				
rCAL mm (mean±sd)	nd	9.58±1.32	9.42±0.66	0.842
2 months				
		p=0.113	p=0.073	
BOP % (mean±sd)	15.86±7.82	42.49±19.79	56.79±22.89	0.026
baseline				
BOP % (mean±sd)	nd	26.12±17.77	25.43±10.28	0.772
2 months				
		p<0.001	p<0.001	
PI % (mean±sd)	18.22±13.14	54.99±13.16	40.49±16.06	0.009
baseline				
PI % (mean±sd)	nd	31.6±18.07	25.24±16.4	0.169
2 months				
		p<0.001	p=0.007	
Active sites (%)	nd	231 (4.5)	169 (3.3)	
Non-active sites (%)	nd	2397 (46.9)	2315 (45.3)	0.7142

CP= chronic periodontitis; AgP= aggressive periodontitis; m=male; f=female; c=caucasian; nc=non-c; sd=standard deviation; PD=pocket depth; rCAL=relative clinical attachment level; BOP=bleeding on probing; PI=plaque index; nd=not determined; Active sites= CAL $\geq$ 1mm after 2 months; p-value was obtained by Mann-Whitney (CP vs AgP), Wilcoxon (baseline vs 2mo) and chi-square (active sites) tests

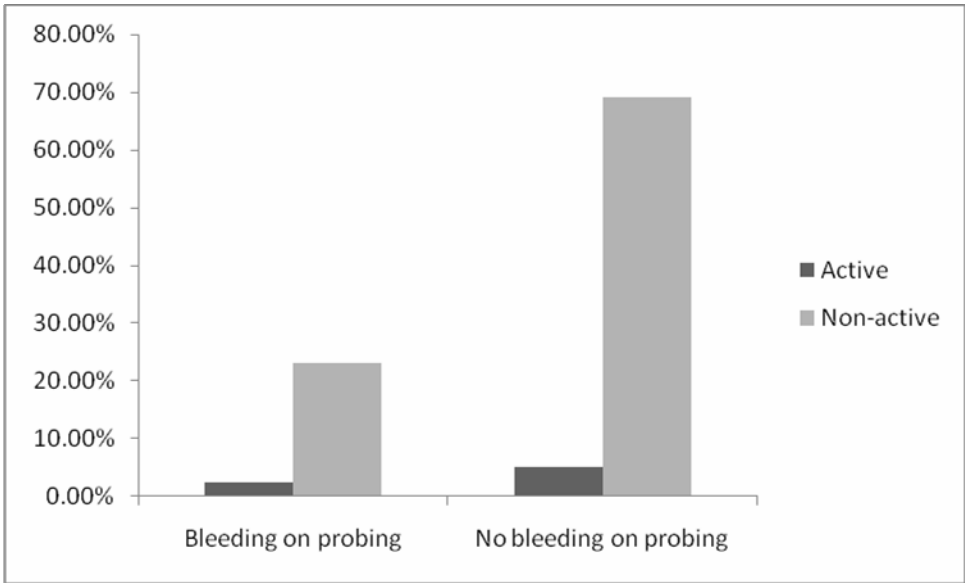

Figure 1 - Activity of periodontal disease and bleeding on probing percentage. Active sites = CAL ≥ 1mm after 2meses; Non- active= sites without attachment loss after 2meses.

Table 2: Aggressive periodontal disease active sites genes differentially expressed compared to the control group genes

Gene	Fold Regulation	p-value	Function
BCL6	-2.9	0.03	others
C3	3.2	0.02	others
C4A	-8.1	0.02	others
C5	4.5	0.01	others
CCL11	3.4	0.01	chemokine
CCL13	5.7	0.00	chemokine
CCL15	4.3	0.04	chemokine
CCL18	-34.9	0.04	chemokine
CCL19	3.1	0.01	chemokine
CCL2	2.6	0.00	chemokine
CCL20	-16.3	0.02	chemokine
CCL23	3.1	0.02	chemokine
CCL26	3.7	0.00	chemokine
CCL3	5.0	0.02	chemokine
CCL5	2.6	0.02	chemokine
CCL7	4.4	0.02	chemokine
CCL8	-8.5	0.04	chemokine
CCR1	2.6	0.02	chemokine receptor
CCR2	4.4	0.02	chemokine receptor
CCR6	3.8	0.01	chemokine receptor
CCR7	3.9	0.04	chemokine receptor
CCR8	4.1	0.02	chemokine receptor
CCR9	5.5	0.02	chemokine receptor
CD40LG	3.4	0.03	cytokine
CEBPB	5.4	0.00	others
CRP	4.2	0.03	others
CXCL1	3.8	0.01	chemokine
CXCL10	4.4	0.04	chemokine
CXCL13	4.5	0.00	chemokine
CXCL14	-8.1	0.02	chemokine
CXCL3	4.6	0.01	chemokine
CXCL9	2.7	0.02	chemokine
IL10	3.7	0.03	cytokine
IL10RA	-3.2	0.04	cytokine receptor
IL10RB	2.4	0.04	cytokine receptor
IL13	3.2	0.01	cytokine
IL13RA1	2.2	0.02	cytokine receptor
IL17C	3.0	0.02	cytokine
IL1A	4.3	0.01	cytokine
IL1B	2.9	0.03	cytokine
IL1F8	4.4	0.01	cytokine
IL1F9	5.5	0.01	cytokine
IL22	4.6	0.01	cytokine
IL5	4.7	0.03	cytokine
IL5RA	3.7	0.01	cytokine receptor
IL8	2.5	0.04	chemokine
IL8RA	11.8	0.00	chemokine receptor
IL9	4.8	0.01	cytokine
IL9R	3.5	0.04	cytokine receptor
LTA	3.4	0.04	cytokine
LTB	7.2	0.00	cytokine
SCYE1	-6.7	0.02	cytokine
SPP1	3.7	0.01	cytokine
TNF	-12.5	0.05	cytokine
TOLLIP	-6.7	0.04	others
XCR1	3.1	0.03	chemokine receptor

Gene = gene expressed significantly in the control group; fold regulation = number of times the expression is increased or decreased compared to the control group, others = others genes involved in inflammatory response

Table 3 - Aggressive periodontal disease not active sites differentially expressed compared to the control group genes

Gene	Fold Regulation	p-value	Function
BCL6	-3.8	0.02	others
C4A	-12.6	0.04	others
CCL18	-26.6	0.04	chemokine
CCL2	1.8	0.00	chemokine
CCL23	-42.8	0.02	chemokine
CCL26	-3.3	0.01	chemokine
CCL8	-16.7	0.03	chemokine
CEBPB	-5.6	0.03	others
CXCL1	5.4	0.00	chemokine
CXCL11	-34.7	0.04	chemokine
CXCL13	3.4	0.01	chemokine
CXCL14	-7.2	0.02	chemokine
CXCL3	3.7	0.02	chemokine
IL13	-80	0.05	cytokine
IL13RA1	1.8	0.04	cytokine receptor
IL1F9	3.0	0.03	cytokine
IL8	2.9	0.03	chemokine
LTB	7.3	0.00	cytokine
IL8RA	4.5	0.01	chemokine receptor
MIF	-0.4	0.03	cytokine
SCYE1	-5.9	0.02	cytokine
TOLLIP	-12.5	0.03	others

Gene = gene expressed significantly in the control group; fold regulation = number of times the expression is increased or decreased compared to the control group, others = others genes involved in inflammatory response

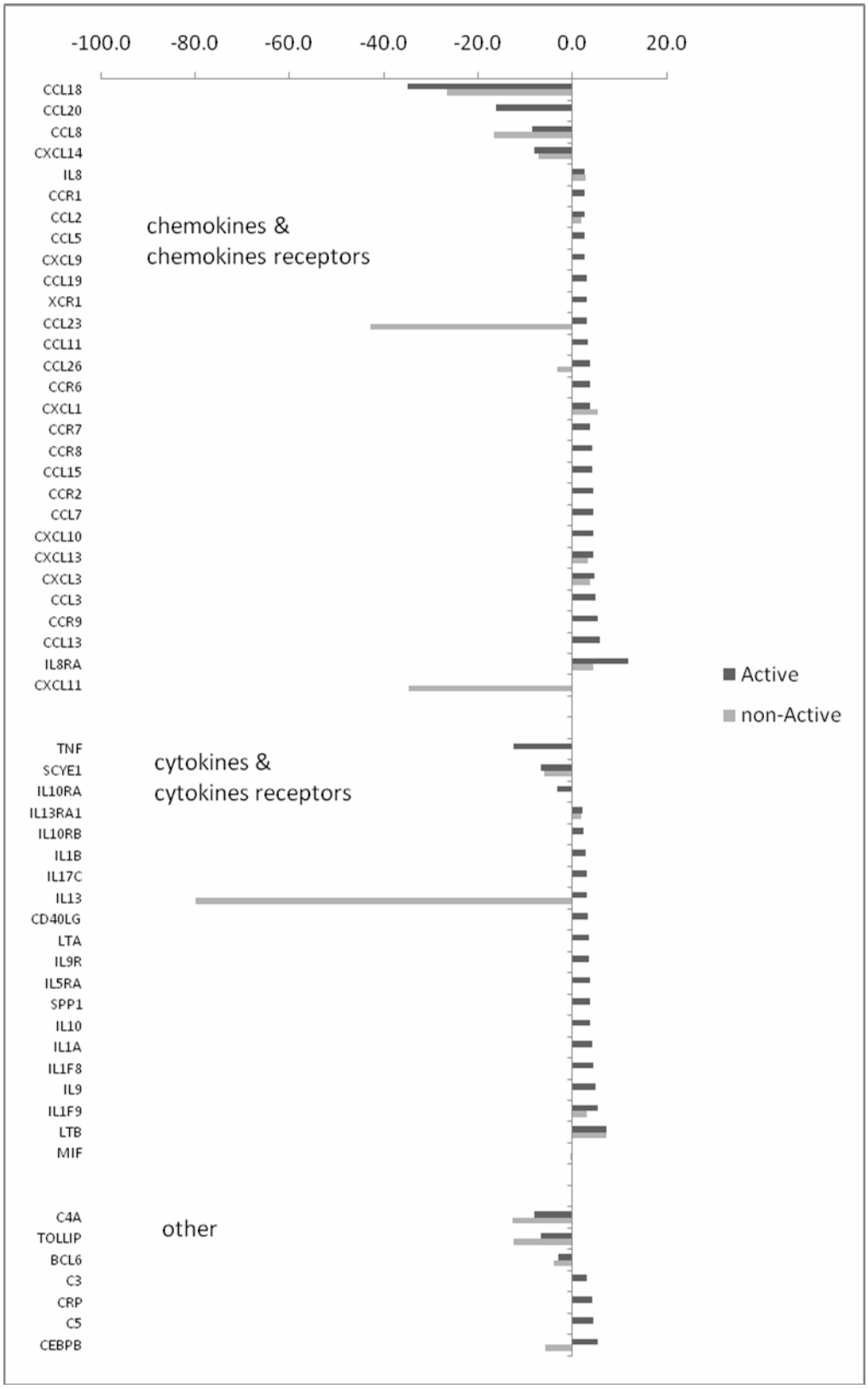

Figure 2 – Comparison of gene expression profile of active and non-active sites of AgP group. The bars located on the positive axis shows up regulated genes and bars located on the negative side of the axis correspond to genes with down-regulation.

Table 4 - Genes of the active sites of chronic periodontitis in comparison to differentially expressed genes in the control group

Gene	Fold Regulation	p-value	Function
BCL6	-2.3	0.04	others
C4A	-50	0.04	others
CCL18	-21.7	0.04	chemokine
CCL19	-30.4	0.04	chemokine
CCL2	-1.1	0.00	chemokine
CCL23	-27.2	0.02	chemokine
CCL26	-5.2	0.03	chemokine
CCL5	-17.7	0.04	chemokine
CCL8	-55.6	0.03	chemokine
CCR1	-22.3	0.04	chemokine receptor
CEBPB	-7.6	0.02	others
CXCL1	2.5	0.04	chemokine
CXCL10	7.0	0.00	chemokine
CXCL11	-50	0.04	chemokine
CXCL13	-4.1	0.02	chemokine
CXCL14	-6.7	0.02	chemokine
CXCL6	-56.1	0.05	chemokine
CXCL9	-22.7	0.04	chemokine
IL10RA	-5.7	0.02	cytokine receptor
IL13	-50	0.05	cytokine
IL13RA1	3.0	0.01	cytokine receptor
IL1RN	12.2	0.01	cytokine receptor
IL8	-20.4	0.05	chemokine
LTB	12.9	0.00	cytokine
MIF	-3.3	0.02	cytokine
SCYE1	-4.1	0.03	cytokine
TNF	-11.1	0.05	cytokine
TOLLIP	-20.0	0.03	others

Gene = gene expressed significantly in the control group; fold regulation = number of times the expression is increased or decreased compared to the control group, others = others genes involved in inflammatory response

Table 5 - Chronic periodontitis non active sites differentially expressed genes compared to control group.

Gene	Fold Regulation	p-value	Function
BCL6	-4.2	0.02	others
C4A	-37.2	0.05	others
CCL18	-45.6	0.04	chemokine
CCL19	-8.6	0.04	chemokine
CCL2	-1.6	0.01	chemokine
CCL23	-43.7	0.02	chemokine
CCL26	-8.3	0.01	chemokine
CCL5	-12.9	0.04	chemokine
CCL8	-45.6	0.02	chemokine
CCR1	-26.1	0.04	chemokine receptor
CEBPB	-4.9	0.04	others
CXCL1	3.2	0.01	chemokine
CXCL11	-58.2	0.04	chemokine
CXCL13	7.2	0.00	chemokine
CXCL14	-6.8	0.02	chemokine
CXCL9	-19.0	0.04	chemokine
IL10RA	-15.8	0.01	cytokine receptor
IL13	-90	0.05	cytokine
IL1F9	3.2	0.01	cytokine
IL5RA	-68.1	0.05	cytokine receptor
IL8	-23.0	0.05	chemokine
LTB	7.2	0.00	cytokine
MIF	-2.1	0.04	cytokine
SCYE1	-5.8	0.02	cytokine
TNF	-14.8	0.04	cytokine
TOLLIP	-12.3	0.03	others

Gene = gene expressed significantly in the control group; fold regulation = number of times the expression is increased or decreased compared to the control group, others = others genes involved in inflammatory response

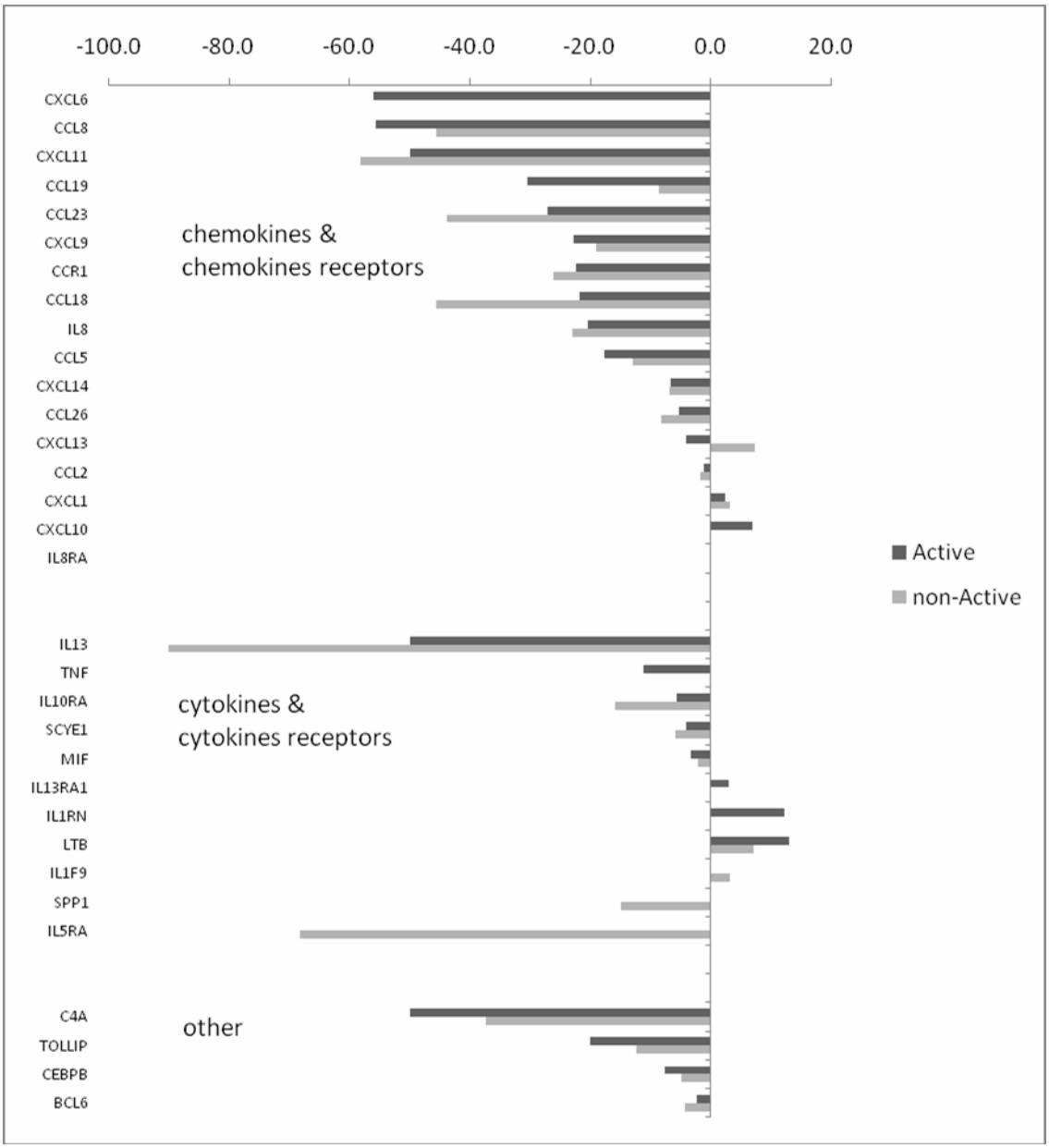

Figure 3 – Comparison of gene expression profile of active and non-active sites of CP group. The bars located on the positive axis shows up regulated genes and bars located on the negative side of the axis correspond to genes with down-regulation.

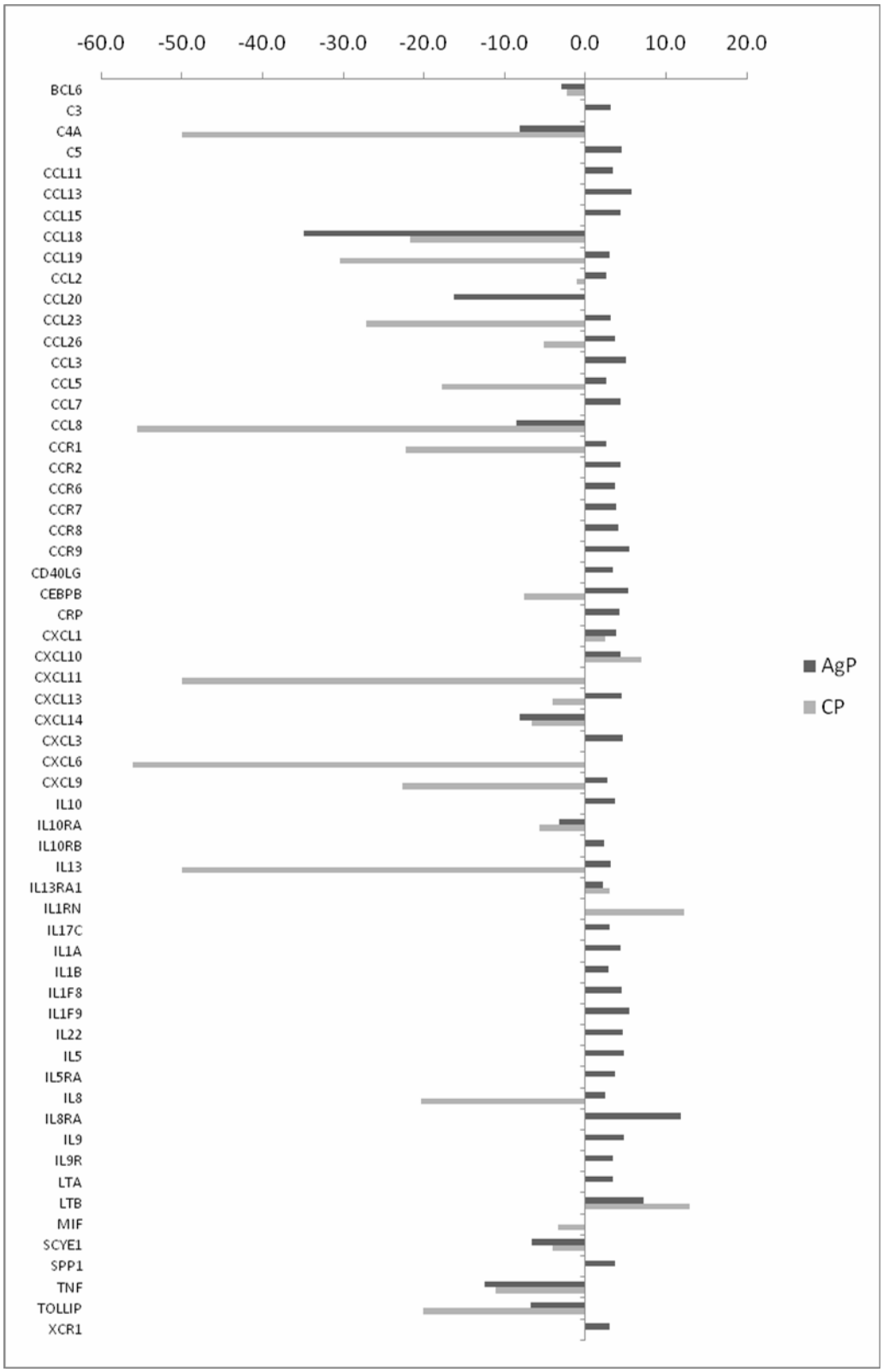

Figure 4 – Gene expression profile of active sites for Aggressive (AgP) and Chronic Periodontitis (CP). The gene expression profile demonstrates a different pattern of inflammatory response. AgP group seems to have a bulky inflammatory response in contrast to a more down-regulated response of the CP group.

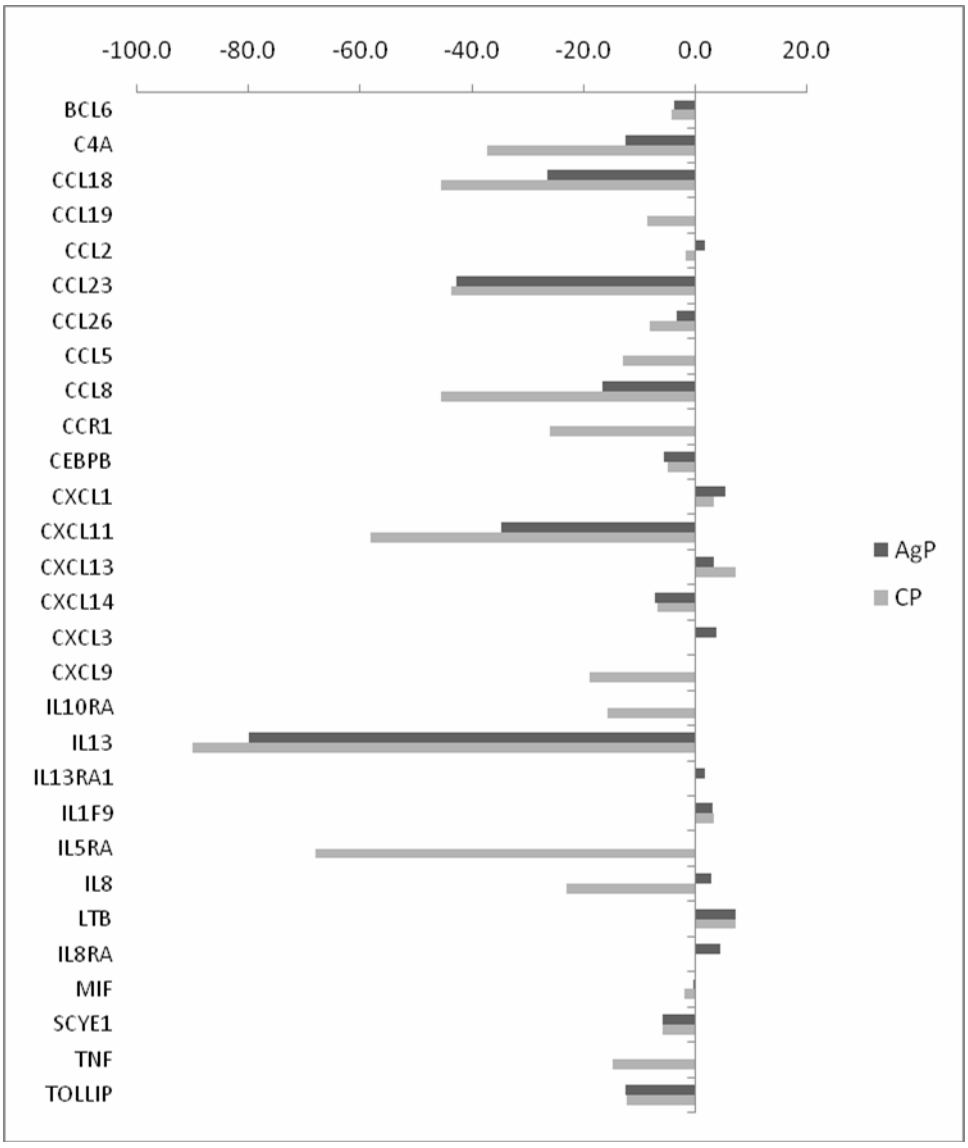

Figure 5 – Gene expression profile of non-active sites for Aggressive (AgP) and Chronic Periodontitis (CP). The gene expression profile demonstrates a similar pattern of inflammatory response for both disease conditions with a down-regulation trend of the genes.The non-active sites showed a reduced number of genes up- or down-regulated in comparison to the active sites.

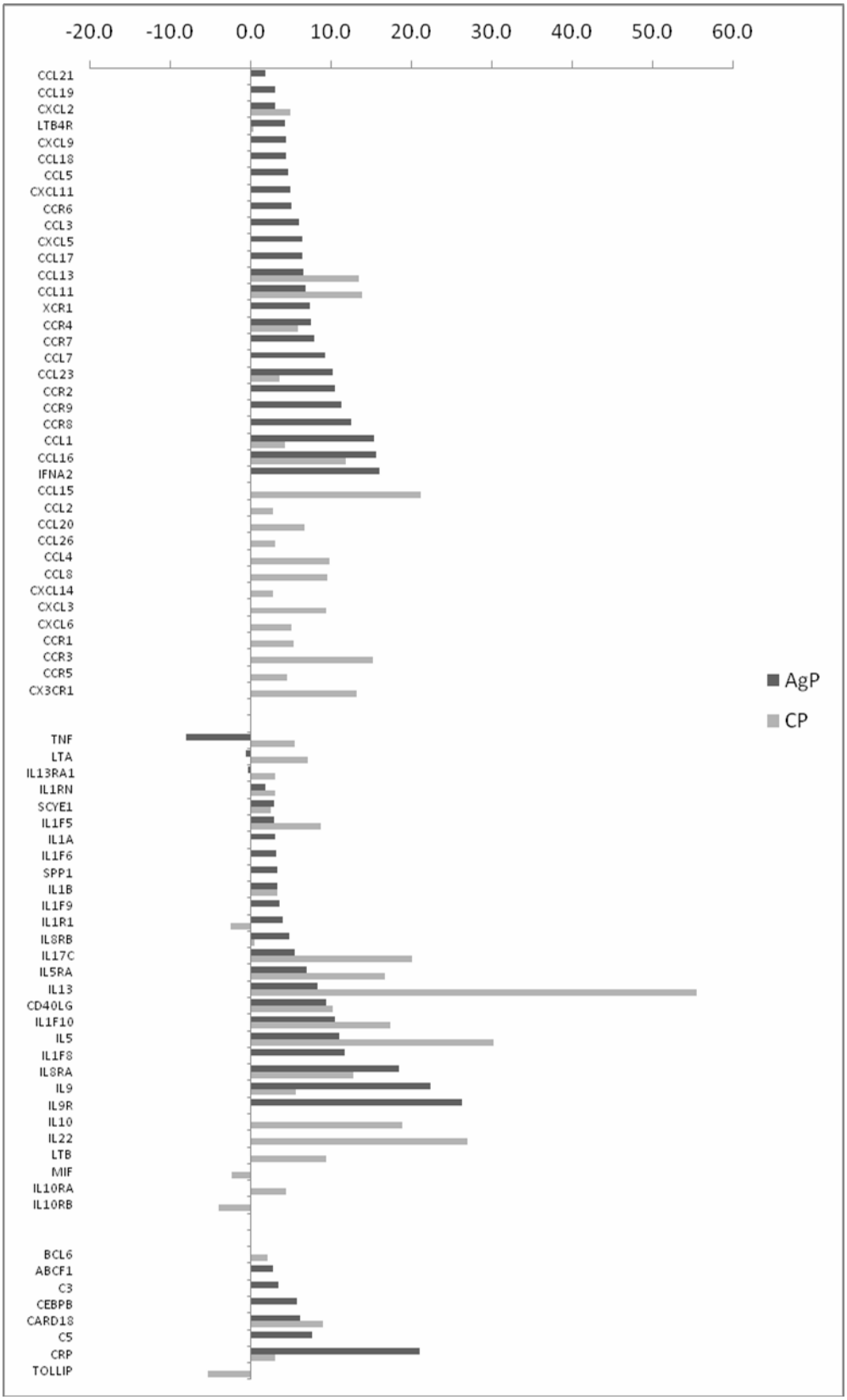

Figure 6 – Differences of gene expression profile between AgP and CP. The bars indicate the number of times that the active sites are up or down-regulated compared to non active sites.

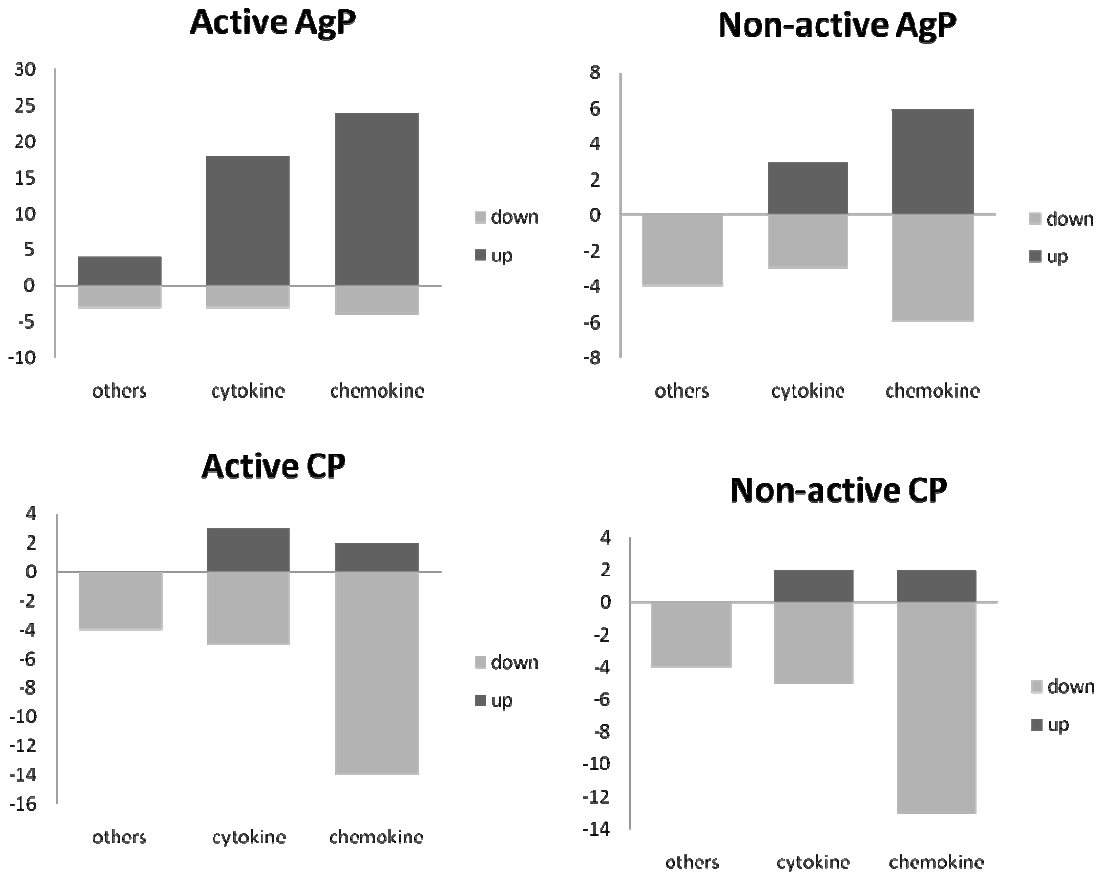

Figure 7 - Genes expressed classification in the groups of PD and disease activity. DPC Active = Chronic Periodontal Disease with disease activity; DPC Non-active = Chronic Periodontal Disease without disease activity, DPA active = Aggressive Periodontal Disease with disease activity; DPA non active= Aggressive Periodontal Disease with no disease activity; up = up regulation, down = down regulation.