



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MATHEUS PASCHOALETTO LOPES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DO A.
actinomycetemcomitans APÓS O TRATAMENTO
PERIODONTAL EM PACIENTES COM PERIODONTITE GRAU C**

PIRACICABA

2021

MATHEUS PASCHOALETTO LOPES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DO A.
actinomycescomitans APÓS O TRATAMENTO
PERIODONTAL EM PACIENTES COM PERIODONTITE GRAU C**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin

Coorientador: Helvis Enri de Sousa Paz

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELO ALUNO MATHEUS PASCHOALETTO LOPES E ORIENTADO PELO PROF. DR. RENATO CORRÊA VIANA CASARIN.

PIRACICABA

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

L881a Lopes, Matheus Paschoaletto, 1998-
Avaliação do perfil transcriptômico do *A. actinomycetemcomitans* após o tratamento periodontal em pacientes com periodontite grau C / Matheus Paschoaletto Lopes. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Renato Corrêa Viana Casarin.
Coorientador: Helvis Enri de Sousa Paz.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Doenças periodontais. 2. Microbiologia. 3. Expressão gênica. I. Casarin, Renato Corrêa Viana, 1982-. II. Paz, Helvis Enri de Sousa, 1995-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Evaluation of the transcriptomic profile of *A. actinomycetemcomitans* after periodontal treatment in patients with grade C periodontitis

Palavras-chave em inglês:

Periodontal diseases

Microbiology

Gene expression

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 15-10-2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus incríveis pais Reinaldo Lopes e Elisiane Aparecida Paschoaletto Lopes, por todo amor, carinho e cuidado comigo, pela minha educação e formação, e por todas as oportunidades proporcionadas durante a minha vida acadêmica que me permitiram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº134260/2021-0.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do magnífico reitor Antonio José de Almeida Meirelles.

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do senhor diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin e ao meu coorientador Me. Helvis Enri de Sousa Paz pelos seus conhecimentos a mim transferidos, por sua dedicação e paciência.

Agradeço aos meus amigos da Turma 61 pela ajuda e companheirismo em todos os momentos da graduação, tanto os festivos quanto os de dificuldade.

RESUMO

O *A. actinomycetemcomitans* é uma das principais bactérias associadas a doença periodontal. Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil transcricional do *A. actinomycetemcomitans* em pacientes com periodontite estágio III-IV grau C após o tratamento periodontal. Três pacientes com periodontite grau C (indivíduos jovens com rápida progressão de doença) foram selecionados, tratados periodontalmente com debridamento periodontal e reavaliados após 3 meses. Foram coletados dados clínicos periodontais e biofilme subgengival do mesmo sítio pré- e pós-tratamento. O RNA do biofilme foi extraído, 6eqüenciado com a plataforma IlluminaMiseq e analisado com ferramentas de bioinformática. Os dados do transcriptoma foram mapeados contra um genoma de referência do *A. actinomycetemcomitans* utilizando a ferramenta HISAT2. A montagem do genoma foi realizada pelo programa Stringtie e a quantificação dos transcritos pelo Kallisto. A análise de expressão diferencial foi realizada com a ferramenta Sleuth. Apesar de melhorias nos parâmetros clínicos, a análise diferencial não demonstrou diferenças no padrão de transcrição do *A. actinomycetemcomitans* antes e após o tratamento ($p>0.05$). Dentre os transcritos mais expressos em ambos os períodos se destacam os associados ao metabolismo e transporte de ferro (como o TonB-dependent receptor e proteína ligante 2fe-25), metabolismo de enxofre e as transposases. Em conclusão, o tratamento periodontal e melhoria da condição clínica periodontal não alteram o perfil transcricional do *A. actinomycetemcomitans*, que mantém a expressão de genes associados à sua virulência e patogenicidade.

Palavras-chave: Doenças periodontais. Microbiologia. Expressão gênica.

ABSTRACT

A. actinomycetemcomitans is one of the main bacteria associated with periodontal disease. This study aimed to evaluate the transcriptional profile of *A. actinomycetemcomitans* in patients with stage III-IV, grade C periodontitis after periodontal treatment. Three patients with grade C periodontitis (young individuals with rapidly progressing disease) were selected. The individuals were treated with periodontal debridement and reevaluated after 3 months. Periodontal clinical data and subgingival biofilm from the same site pre- and post-treatment were collected. Biofilm RNA was extracted, sequenced with the Illumina Miseq platform and analyzed with bioinformatics tools. The transcriptome data was mapped against a reference genome of *A. actinomycetemcomitans* using the HISAT2 tool. Genome assembly was performed by the Stringtie program and quantification of transcripts by Kallisto. Differential expression analysis was performed with the Sleuth tool. Despite improvements in clinical parameters, the differential analysis showed no differences in the transcription pattern of *A. actinomycetemcomitans* before and after treatment ($p > 0.05$). Among the most expressed transcripts in both periods were those associated with iron metabolism and transport (such as TonB-dependent receptor and 2fe-25 binding protein), sulfur metabolism and transposases. In conclusion, periodontal treatment and improvement of periodontal clinical condition do not alter the transcriptional profile of *A. actinomycetemcomitans*, which maintains the expression of genes associated with its virulence and pathogenicity.

Key words: Periodontal diseases. Microbiology. Gene expression.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
3 PROPOSIÇÃO	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Seleção de pacientes	16
4.2 Tratamento periodontal e medicamentoso	16
4.3 Coleta das amostras	17
4.1 Análise laboratorial e Bioinformática	18
5 RESULTADO	20
6 DISCUSSÃO	22
7 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25
ANEXOS	31
Anexo 1 –Verificação de originalidade e prevenção de plágio	31
Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa	32
Anexo 3 – Iniciação Científica	33

1 INTRODUÇÃO

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

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

Atualmente, na era pós-genômica, a avaliação dos transcritos de bactérias tem se tornado alvo de grande interesse com a finalidade de identificar e compreender o sistema biológico desses microrganismos. Os pesquisadores lançam mão da bioinformática para que os dados sejam integrados, organizados e relacionados e desta forma novas opções de tratamento para as mais diversas patologias sejam estabelecidas. Assim, estudos envolvendo as diversas ômicas são as novas fronteiras da ciência visando a bioprospecção dos microrganismos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

As doenças periodontais são processos patológicos que envolvem o periodonto, um termo usado para descrever o aparelho de suporte que envolve o dente, que inclui o tecido gengival, osso alveolar, cemento e ligamento periodontal. (Pihlstrom et al., 2005; Highfield et al., 2009; Kinane et al., 2017)

A gengivite é a forma mais branda de doença periodontal e pode ser encontrada em até 90% da população. É um termo utilizado para descrever a inflamação da gengiva devido ao acúmulo de bactérias e detritos entre a linha da gengiva e o dente, também conhecido como biofilme dental. A gengivite é uma condição reativa reversível com a melhora da higiene oral. Por outro lado, a periodontite ocorre quando a condição periodontal progrediu além da gengivite para um estado de doença inflamatória crônica, destrutiva e irreversível. As bactérias podem então penetrar mais profundamente nos tecidos e no periodonto circundante. Isso desencadeia uma resposta do hospedeiro em uma tentativa de se defender contra as bactérias invasoras. No entanto, durante o processo de proteção contra a bactéria, as defesas do hospedeiro também levam à destruição do periodonto (Pihlstrom et al., 2005; Highfield et al., 2009; Kinane et al., 2017).

Em 2017, a American Academy of Periodontology, em colaboração com a European Federation of Periodontology, elaborou uma nova classificação das doenças periodontais e peri-implantares. Nesta nova classificação, a periodontite pode ser subdividida em três categorias: Doenças periodontais necrosantes, periodontite, e periodontite como manifestação de doenças sistêmicas. A doença periodontal necrosante refere-se a uma doença virulenta de progressão rápida que é vista principalmente em pacientes imunossuprimidos, como aqueles com HIV. Esta forma de doença periodontal inclui necrose da gengiva encontrada entre os dentes, sangramento e dor associada. (Caton et al., 2018; Babay et al., 2019)

Essas doenças são classificadas em 4 estágios (I a IV) baseados na gravidade e extensão do tratamento necessário e é determinado um estágio dependendo de fatores como perda de inserção clínica, perda óssea radiográfica e perda dentária, a saber: estágio I (periodontite inicial), estágio II (periodontite moderada), estágio III (periodontite grave com potencial para perda adicional do dente) e estágio IV (periodontite grave com potencial de perda da dentição). Além disso, a classificação também usa uma medida para descrever a taxa de progressão da doença em Grau A (baixa taxa de progressão), Grau B (progressão esperada) e Grau C (alto risco de progressão) com base na evidência de fatores de risco associados, como tabagismo e diabetes mellitus (Caton et al., 2018).

O prognóstico da doença periodontal depende do estágio e grau da doença, da presença de fatores de progressão adicionais e do tratamento e manejo da doença. Quanto maior o estágio e mais rapidamente progressivo o grau, pior é o prognóstico da doença. Além disso, fatores como tabagismo e diabetes mellitus não controlados afetam o prognóstico da doença. O guia usado para determinar o prognóstico da doença foi desenvolvido por McGuire e é usado para prever a sobrevivência de dentes individuais. Com base em uma combinação de fatores, cada dente recebe uma pontuação que varia de bom, regular, ruim, questionável ou sem esperança. O guia é útil e deve ser usado em todos os casos de avaliação inicial da doença, reavaliação após terapia periodontal e monitoramento de longo prazo. O guia faz uso de fatores como idade do paciente, estado médico, estado de higiene oral, nível socioeconômico, tipo e distribuição da perda óssea e condição periodontal atual (Ioannou et al., 2014; Martinez-Canut e Llobell, 2018).

O *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é uma bactéria Gram-negativa considerada um dos principais patógenos associado esta condição (Haubek, 2010). O *A. actinomycetemcomitans* é um cocobacilo Gram-negativo anaeróbico capnófilico, não formador de esporos, imóvel e um microorganismo patogênico bastante estudado por muitos pesquisadores. Essa bactéria também está associada a infecções sistêmicas que podem resultar em endocardite bacteriana (Wang et al., 2010), meningite e abscessos cerebrais (Stepanović et al., 2005). Além disso, o *A. actinomycetemcomitans* também foi detectado em placas de ateroma e em placentas de mulheres com pré-eclâmpsia, uma complicação da gravidez que causa hipertensão e acarreta risco para a mãe e o feto (Barak et al, 2007). Contudo, o principal papel se destaca na etiologia da doença periodontal, incluindo a periodontite agressiva localizada, crônica e refratária (Slots et al., 1986; Zambon et al., 1996). Além disso, alguns estudos têm evidenciado a presença dessa bactéria na microbiota residente da cavidade oral em paciente com parâmetros clínicos de saúde periodontal. (Tan et al., 2002)

Fatores de virulência são características de um microorganismo que o ajudam a colonizar um nicho específico no hospedeiro, superar o sistema imune de defesa, iniciando dessa forma o processo de doença. O *A. actinomycetemcomitans* tem vários fatores de virulência que proporcionam aumento da sua sobrevivência na cavidade bucal o tornando capaz de contornar/escapar das estratégias protetoras do sistema imune do hospedeiro. Muitos desses fatores de virulência tem se mostrado envolvidos na patogênese da doença periodontal. (Fives-Taylor et al., 1999)

A colonização inicial do sulco gengival e em seguida da bolsa periodontal são classificadas como as etapas iniciais da doença periodontal. A capacidade dos

microorganismos de aderirem às superfícies da cavidade bucal é crucial para que a colonização bacteriana ocorra. Portanto, existe um grande esforço e interesse de diversos pesquisadores na busca por compreender os mecanismos pelos quais o *A. actinomycetemcomitans* coloniza as células hospedeiras. (Rose et al., 2003)

O *A. actinomycetemcomitans* tem a capacidade de se aderir ao epitélio oral e superfícies dos dentes, se coagregar com outras bactérias, bem como invadir células orais. Essas etapas são eventos fundamentais para a patogênese das doenças periodontais. A adesão e invasão do *A. actinomycetemcomitans* às células epiteliais orais envolvem interações complexas específicas e inespecíficas, além da participação de outros componentes reguladores desse processo que não estão completamente elucidados (Meyer e Fives-Taylor, 1994). Estudos têm mostrado que a capacidade do *A. actinomycetemcomitans* em se aderir à hidroxiapatita da superfície dentária e as células do epitélio oral está associada às fímbrias, vesículas extracelulares, bem como material extracelular amorfo vistos em nível ultraestrutural. (Meyer e Fives-Taylor, 1994) As primeiras (fímbrias) são estruturas essenciais na adesão e formação do biofilme dental. De fato, isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans* são classicamente conhecidos por sua capacidade de formar biofilmes incrivelmente tenazes in vitro (Fine et al., 1999).

A capacidade de crescimento bacteriano sob a forma de biofilme é fundamental para que as bactérias orais causem doenças, e o crescimento como um biofilme oferece muitas vantagens a esses microorganismos. Além disso, na cavidade oral, falha nos mecanismos de fixação e crescimento das bactérias como um biofilme resultará em uma eliminação rápida. Portanto, os biofilmes complicam o tratamento da doença periodontal, protegendo as bactérias do sistema imunológico, diminuindo a eficácia dos antibióticos, além de permitir a dispersão de células planctônicas para locais distantes que podem auxiliar na reinfecção (Cvitkovitch et al., 2003). Outro fator complicador é que a resposta imune inflamatória do hospedeiro não é efetiva na destruição das bactérias dentro dos biofilmes e frequentemente resulta em danos aos tecidos periodontais circundantes por meio da liberação crônica de mediadores inflamatórios, numa tentativa do organismo de superar o desafio bacteriano persistente. Essa resistência elevada a antimicrobianos e antissépticos pode explicar porque infecções por *A. actinomycetemcomitans* são tão difíceis de serem erradicadas por terapia periodontal convencional (Takamatsu et al., 1999). Além disso, colônias rugosas de *A. actinomycetemcomitans* tem uma capacidade maior de formar biofilme, bem como maior resistência a mudanças de pH e salinidade. Essa propriedade é favorecida pela presença de fímbrias, por proporcionar aumento da interação entre

microorganismos e superfícies, permitindo uma maior estabilização do biofilme dentário (Inoue et al., 2003)

Produtos bacterianos como as sialidases, vêm sendo consideradas fatores de virulências de uma série de microorganismos patogênicos que colonizam as superfícies mucosas do corpo. Essas sialidases são enzimas que catalisam uma reação de conversão (hidrolise) do ácido sialico em glicolípidos, glicoproteínas e polissacarídeos presentes na membrana celular. A administração de sialidase expõe receptores beta-galactosil que atuam no processo de aderência das bactérias as superfícies mucosas do hospedeiro. (Schauer e Kamerling, 2018)

Esses achados têm impulsionado diversos estudos empregando agentes antimicrobianos visando o controle e tratamento das doenças periodontais, especialmente em casos de doença periodontal persistente refratária a terapias não farmacológicas. Nessas situações, os antibióticos podem ser administrados tanto local quanto sistemicamente, dependendo da gravidade da doença, e têm se mostrado uma ferramenta interessante no tratamento e controle dessas doenças. (Schauer e Kamerling, 2018)

Embora a raspagem, alisamento radicular e a intervenção cirúrgica sejam as bases da terapia periodontal, a utilização de antibióticos adjuvantes pode melhorar a eficácia do tratamento, especialmente em indivíduos com tipos de doenças periodontais de difícil tratamento (Slots et al., 2004; Barak et al., 2007). O uso de antimicrobianos, geralmente administrada de forma sistêmica, oferece vários benefícios no tratamento da doença periodontal. Além de agirem contra patógenos que invadiram os tecidos moles, mas também pode inibir microorganismos em outros locais que são relativamente de difícil acesso, por exemplo, bolsas periodontais estreitas e profundas (Oettinger-Barak et al., 2013). A literatura descreve uma série de protocolos empíricos para o tratamento sistêmico da periodontite baseados na administração via oral principalmente de doxiciclina (Mandell et al., 1986; Akincibay et al., 2008), clindamicina (Sigusch et al., 2001), amoxicilina (Kunihira et al., 1985; Rooney et al., 2002), metronidazol (Saxén e Asikainen, 1993; Noyan et al., 1997) ou a combinação destes dois últimos (van Winkelhoff et al., 1989; Winkel et al., 2001; Rooney et al., 2002). Contudo, atualmente não há protocolos universalmente aceitos com relação a antibioticoterapia e o *A. actinomycetemcomitans*.

O gluconato de clorexidina, por exemplo, é um composto antimicrobiano comumente utilizado na periodontia clínica, especialmente em conjunto com a terapia periodontal mecânica. Apesar de ser frequentemente administrado como enxágue bucal, o gluconato de clorexidina também pode ser usado como gel, verniz e chip subgengival. O uso

de clorexidina, além da escovação regular, pode levar à redução do acúmulo de biofilme dental e, portanto, tem se mostrado muito benéfico no tratamento da periodontite crônica. Há um avanço relativamente novo na farmacoterapia para a doença periodontal. É um chip de gluconato de clorexidina que é inserido na bolsa periodontal após a conclusão da limpeza e fornece liberação sustentada de longo prazo de gluconato de clorexidina na área afetada (Pietruska et al., 2006; Kumar et al., 2014; Jhinger et al., 2015)

Outra opção é um composto antimicrobiano adjuvante usado após a terapia periodontal mecânica. É composto por microesferas de cloridrato de minociclina que são colocadas nas bolsas circundantes após o debridamento mecânico. Seu efeito é semelhante ao do chip de clorexidina, pois reduz efetivamente o acúmulo de placa dentária (Lu e Chei., 2005). Além disso, os antibióticos sistêmicos às vezes são indicados, como no caso de bolsas periodontais profundas persistentes. Os agentes antimicrobianos mais comuns prescritos incluem: tetraciclina, penicilinas, macrolídeos, quinolonas, cefalosporinas, compostos de nitroimidazol. Esses agentes farmacológicos variam em modos de ação e podem ser prescritos para pacientes com uma variedade de microrganismos suscetíveis, incluindo aqueles com resistência antibacteriana. Além disso, esses agentes podem ser prescritos isoladamente ou em combinação para expandir ainda mais seu uso. (Leszczyńska et al., 2011; Blair e Chapple, 2014; Barca et al., 2015).

Muitos ensaios clínicos com amostras randomizados, bem como revisões sistemáticas da literatura têm mostrado que antimicrobianos sistêmicos e/ou locais adjuvantes, quando combinados ao debridamento mecânico, oferecem melhorias clínicas àquelas obtidas somente com raspagem e alisamento radicular. Embora, esses efeitos sejam notórios na periodontite agressiva, existe uma lacuna nos estudos que buscam demonstrar a ação de tais substâncias sobre a expressão dos genes de virulência e de seus transcritos pela principais bactérias relacionadas a periodontite agressiva. (Jepsen e Jepsen, 2016)

3 PROPOSIÇÃO

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

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de pacientes

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

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

4.2 Tratamento periodontal e medicamentoso

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

1. Terapia inicial: Todos os pacientes foram instruídos sobre as causas e consequências da doença periodontal bem como sobre técnicas preventivas, incluindo técnica de escovação sulcular e uso de fio dental. Foram fornecidas aos indivíduos escovas macias em conjunto a um dentífrício fluoretado. Foi realizada remoção profissional de

biofilme e cálculo supragengival, além de fatores de retenção de biofilme quando necessário.

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

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

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

4.3 Coleta das amostras

As coletas do biofilme subgengival foram realizadas no baseline e nos mesmos sítios após 3 meses do procedimento. A área foi devidamente isolada com rolos de algodão esterilizados. A porção supragengival do biofilme foi removida, e então foi removida uma porção do biofilme subgengival através de curetas periodontais (Hu-friedy, Chicago, IL- EUA), e acondicionados em meio RNAlater. O RNA total foi extraído através do protocolo kit de extração específico (RNAeasy Mini Kit, Valencia, CA) associado com uma adição prévia dos seguintes buffers de extração: Lisozima 20mg/ml (Thermo Fischer Scientific, MA) +

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

4.4 Análise laboratorial e Bioinformática

Antes do sequenciamento, as amostras foram re-analisadas quanto à qualidade e pureza, no aparelho Bioanalyzer, necessitando de um RIN adequado e concentração mínima (Figura 1).

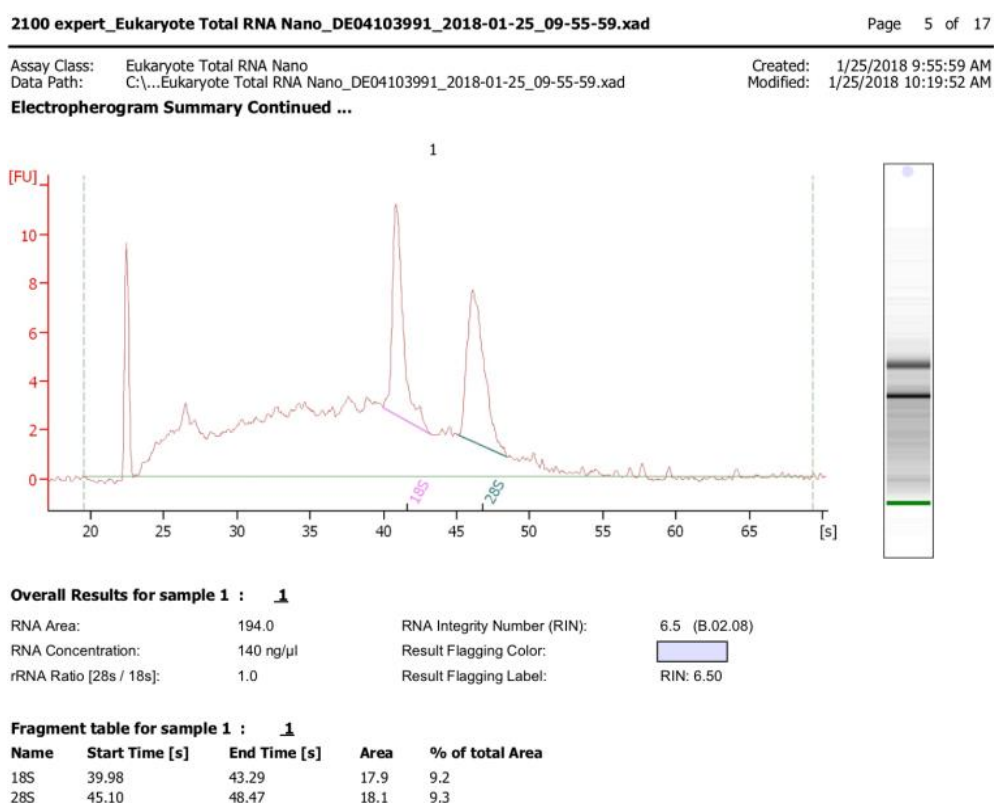


Figura 1 - Análise da amostra de RNA feita pelo Bioanalyzer

Após determinar quantidade e qualidade, as amostras passaram pelo tratamento com RIBO0 (Ribo-Zero; Gold Epidemiology Kit, Illumina) que remove rRNA mitocondrial de humano/animal e de micro-organismos unicelulares, resultando em uma amostra com RNAm com maior pureza. As amostras foram então tratadas para inclusão de tags, clusterizadas e sequenciadas 2 x 100 no equipamento HiSeq2500. A partir do sequenciamento, foi iniciada a análise de bioinformática, realizada pela Dra. Melline Fontes (Core for Research Informatics - University of Illinois at Chicago – UIC). O pipeline utilizado inclui a leitura das sequências no software FastQC (Andrews 2010), o tratamento de qualidade das sequências pelos softwares Fastxclipper 0.0.12 (the FASTX-toolkit)

Trimmomatic 0.38 (Bolger et al., 2014), utilizando parâmetros de análise: ILLUMINACLIP:2:30:10, LEADING:15, TRAILING:15, SLIDINGWINDOW:4:20 e MINLEN:50. A remoção de rRNA residual foi realizada pelo software SortMeRNA 2.1 e do genoma humano residual pelo Bowtie2. Os dados do transcriptoma foram mapeados contra um genoma de referência do *A. actinomycetemcomitans* utilizando a ferramenta HISAT2. A montagem do genoma foi realizada pelo programa Stringtie e a quantificação dos transcritos pelo Kallisto. A análise de expressão diferencial entre os grupos baseline e pós-tratamento foi realizada com a ferramenta Sleuth.

5 RESULTADOS

Clinicamente, os pacientes do estudo apresentaram reduções significativas ($p<0.05$) nos parâmetros de: profundidade de sondagem ($3,69\pm1,78$ baseline versus $2,98\pm1,70$ pós-tratamento); profundidade de sondagem do sítio coletado ($6,29\pm0,95$ baseline versus $3,29\pm0,95$ pós-tratamento); e sangramento à sondagem ($0,54\pm0,50$ baseline versus $0,29\pm0,46$ pós-tratamento) (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados demográficos e clínicos dos grupos baseline e pós-tratamento.

	Baseline (n=3)	3 meses (n=3)
Gênero (%F)	67	67
Idade (anos)	$36,33\pm2,52$	$36,33\pm2,52$
IP (%±DP)	$0,51\pm0,50$	$0,52\pm0,50$
IG (%±DP)	$0,49\pm0,50$	$0,49\pm0,50$
NIC (mm±DP)	$3,77\pm1,81$	$3,15\pm 1,58$
PS (mm±DP)	$3,69\pm 1,78$	$2,98\pm 1,70^*$
SS(%±DP)	$0,54\pm 0,50$	$0,29\pm 0,46^*$
PS Sítio Coletado (mm±DP)	$6,29\pm0,95$	$3,29\pm0,95^*$

* Indica diferença estatisticamente significativa entre 3 meses e baseline (Teste t de Student, $P<0,05$).

A figura de calor mostra a quantidade de transcritos identificados em cada amostra (Figura 2). Vermelho representa uma maior quantidade de transcritos identificados enquanto a cor azul, uma menor.

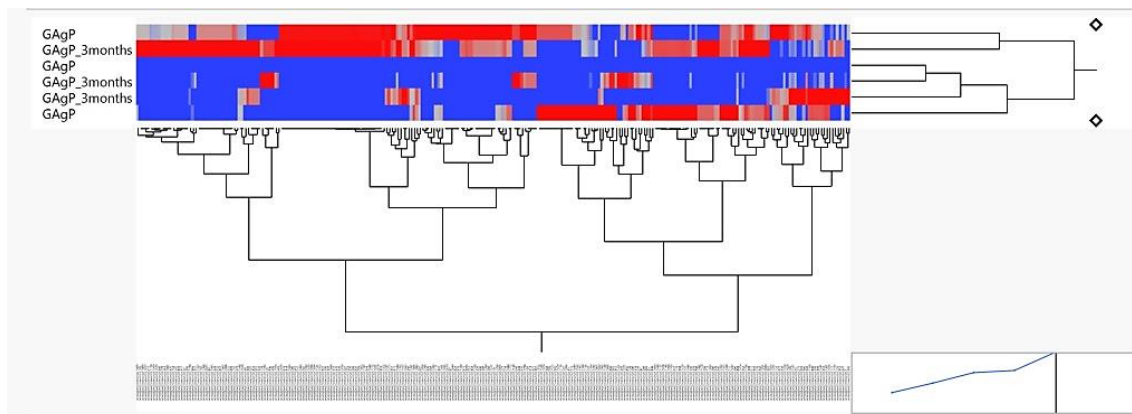


Figura 2 - Figura de calor dos transcritos mais expressos pelo *A. actinomycetemcomitans*.

A análise de expressão diferencial mostrou que não houve diferenças nos transcritos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre os dois grupos (Tabela 2). A análise linear discriminante (LDA) mostrou um padrão de expressão no baseline característico pela expressão de dois transcritos em cada grupo (Figura 3).

Tabela 2 - Análise dos top 10 transcritos diferencialmente expressos pelo *A. actinomycetemcomitans* nos grupos baseline e pós-tratamento.

Gene	Baseline(TPM)	3 meses (TPM)	qvalue
tRNA-Ala	72478,50	79961,06	> 0.05
TonB-dependent receptor	72478,50	79961,06	> 0.05
type IIA DNA topoisomerase subunit B	72478,50	79961,06	> 0.05
purinepermease	50441,50	53743,16	> 0.05
LPS kinase	17304,70	31793,13	> 0.05
AAA familyATPase	14423,40	8636,44	> 0.05
50S ribosomalprotein L10	7210,40	9848,46	> 0.05
glutamateformimidoyltransferase	7210,40	9848,46	> 0.05
DUF3078 domain-containingprotein	13980,90	1723,42	> 0.05
4Fe-4S bindingprotein	83338,76	20098,28	> 0.05

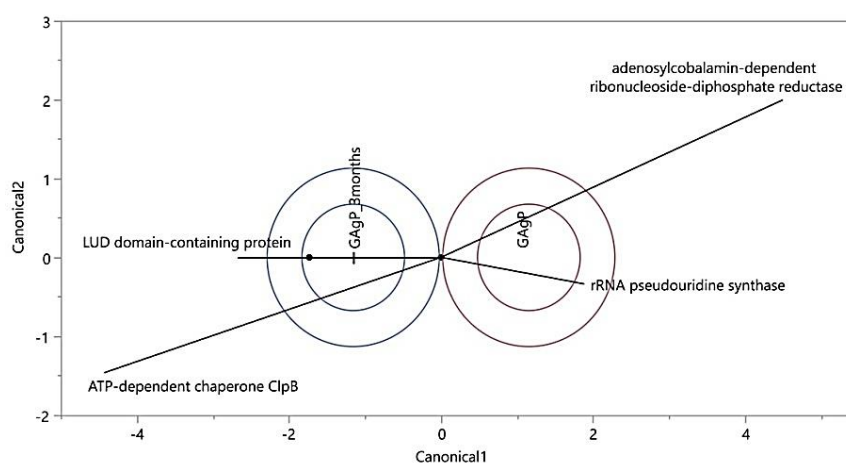


Figura 3 - Análise linear discriminante dos transcritos associados com *A. actinomycetemcomitans* antes e depois do tratamento periodontal

6 DISCUSSÃO

A metodologia empregada é pioneira na área de Periodontia para identificação de transcritos a partir do alinhamento de dados do sequenciamento de transcriptoma com o genoma de referência de periodontopatógenos. Nossos resultados mostram que apesar de alguns poucos genes estarem associados com o perfil de expressão do *A. actinomycetemcomitans* nos dois grupos, o tratamento periodontal associado com antibioticoterapia, no geral, não muda o perfil funcional do Aa em pacientes com periodontite grau C.

Clinicamente, a redução significativa dos parâmetros periodontais após 3 meses utilizando essa posologia de antibiótico já era esperada, e em pacientes com esse perfil de doença periodontal, essa melhoria significativa também foi observada em estudos clínicos anteriores (Casarin et al., 2012).

Apesar desse estudo não ter avaliado quantitativamente e proporcionalmente o efeito do tratamento nas concentrações de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a literatura mostra que a combinação antibiótica de amoxicilina + metronidazol como adjunto a raspagem e alisamento radicular promove redução significativa desse patógeno no biofilme subgengival (Aimetti et al., 2012; Casarin et al., 2012), e a redução na proporção dessa espécie pode estar relacionado até mesmo com os benefícios clínicos obtidos (Guerrero et al., 2014). Em conjunto com os achados de manutenção da expressão gênica nesse estudo, pode ser hipotetizado que os benefícios clínicos obtidos após a terapia periodontal podem estar relacionados à redução quantitativa desse patógeno, mesmo que ele ainda mantenha uma expressão semelhante após o tratamento.

Levando em consideração que a periodontite é uma doença polimicrobiana e que o ecossistema subgengival é altamente complexo e dinâmico, a alteração na proporção de determinadas espécies bacterianas pode influenciar na dinâmica de colonização de outras espécies e aumento do potencial de virulência dessas, ou seja, através de uma ação indireta (Hajishengallis e Lamont, 2012). Dessa forma, o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pode atuar como sendo uma dessas espécies que podem agir sinergicamente com outras espécies, promovendo interações metabólicas com outros membros da comunidade subgengival e aumentando o potencial de virulência de maneira indireta (Hajishengallis e Lamont, 2016). Isso explicaria, por exemplo, o impacto da redução desse patógeno na melhoria dos parâmetros clínicos após o tratamento.

A análise discriminar linear mostra que os transcritos do baseline parecem estar mais expressos com o metabolismo de ácidos nucleicos, bem como regulação do DNA e RNA (Ofengand, 2002). Enquanto isso, os transcritos mais associados com o pós-tratamento parecem estar relacionados com o metabolismo de lactato (Hwang et al., 2013) e metabolismo de proteínas de ligação (Barnett et al., 2003). O papel de transcritos de RNA não-codificantes ainda não está totalmente elucidado, entretanto, estudos recentes já apontam que esses transcritos podem desempenhar funções regulatórias importantes no ambiente de doença periodontal (Ram-Mohane Meyer, 2020).

Assim, no contexto discutido acima, pode-se sugerir que o tratamento com antimicrobianos é capaz de produzir efeitos clínicos benéficos. Contudo, a eliminação de agentes microbianos é rara e desnecessária. Embora com a melhora clínica haja o estabelecimento de novas condições ambientais na bolsa periodontal e na comunidade bacteriana, o Aa mantém seu perfil transcriptômico, com manutenção de vias de virulência e potencial de estimular a resposta inflamatória nos tecidos.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que, independentemente do debridamento mecânico associado à antibioticoterapia em pacientes com periodontite grau C, o *A. actinomycetemcomitans* mantém seu perfil de expressão gênica, mesmo após melhora clínica.

REFERÊNCIAS*

- Aimetti M, Romano F, Guzzi N, Carnevale G. Full-mouth disinfection and systemic antimicrobial therapy in generalized aggressive periodontitis: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Periodontol*. 2012 Mar;39(3):284-94. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01795.x.
- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975 Dec;25(4):229-35.
- Akincibay H, Orsal SO, Sengün D, Tözüm TF. Systemic administration of doxycycline versus metronidazole plus amoxicillin in the treatment of localized aggressive periodontitis: a clinical and microbiologic study. *Quintessence Int*. 2008 Feb;39(2):e33-9.
- Albandar JM. Aggressive and acute periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2014a Jun;65(1):7-12. doi: 10.1111/prd.12013.
- Albandar JM. Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Periodontol 2000*. 2014b Jun;65(1):13-26. doi: 10.1111/prd.12014.
- Andere NMRB, Castro Dos Santos NC, Araujo CF, Mathias IF, Taiete T, Casarin RCV, et al. Clarithromycin as an Adjunct to One-Stage Full-Mouth Ultrasonic Periodontal Debridement in Generalized Aggressive Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol*. 2017 Dec;88(12):1244-1252. doi: 10.1902/jop.2017.170165.
- Babay N, Alshehri F, Al Rowis R. Majors highlights of the new 2017 classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *Saudi Dent J*. 2019 Jul;31(3):303-305. doi: 10.1016/j.sdentj.2019.04.006.
- Barak S, Oettinger-Barak O, Machtei EE, Sprecher H, Ohel G. Evidence of periopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia. *J Periodontol*. 2007 Apr;78(4):670-6. doi: 10.1902/jop.2007.060362.
- Barca E, Cifcibasi E, Cintan S. Adjunctive use of antibiotics in periodontal therapy. *J Istanbul Univ Fac Dent*. 2015 Jan 12;49(3):55-62. doi: 10.17096/jiufd.90144.
- Barnett ME, Zolkiewska A, Zolkiewski M. Structure and activity of ClpB from *Escherichia coli*. Role of the amino- and -carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem*. 2000 Dec 1;275(48):37565-71. doi: 10.1074/jbc.M005211200.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Blair FM, Chapple IL. Prescribing for periodontal disease. *Prim Dent J*. 2014 Nov;3(4):38-43. doi: 10.1308/205016814813877234.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.

Casarin RC, Ribeiro Edel P, Mariano FS, Nociti FH Jr, Casati MZ, Gonçalves RB. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontol Res*. 2010 Oct;45(5):635-42. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01278.x.

Casarin RC, Peloso Ribeiro ED, Sallum EA, Nociti FH Jr, Gonçalves RB, Casati MZ. The combination of amoxicillin and metronidazole improves clinical and microbiologic results of one-stage, full-mouth, ultrasonic debridement in aggressive periodontitis treatment. *J Periodontol*. 2012 Aug;83(8):988-98. doi: 10.1902/jop.2012.110513.

Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S1-S8. doi: 10.1111/jcpe.12935.

Chambers DC, Carew AM, Lukowski SW, Powell JE. Transcriptomics and single-cell RNA-sequencing. *Respirology*. 2019 Jan;24(1):29-36. doi: 10.1111/resp.13412.

Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Aug;32(8):860-6. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00777.x.

Cvitkovitch DG, Li YH, Ellen RP. Quorum sensing and biofilm formation in *Streptococcal* infections. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(11):1626-32. doi: 10.1172/JCI20430.

Deas DE, Mealey BL. Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment. *Periodontol 2000*. 2010 Jun;53:154-66. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00334.x.

Fine DH, Furgang D, Kaplan J, Charlesworth J, Figurski DH. Tenacious adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain CU1000 to salivary-coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol*. 1999 Dec;44(12):1063-76. doi: 10.1016/s0003-9969(99)00089-8.

Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000*. 1999 Jun;20:136-67. doi: 10.1111/j.1600-0757.1999.tb00161.x.

Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A, et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol*. 2005 Feb;76(2):289-94. doi: 10.1902/jop.2005.76.2.289.

Guerrero A, Nibali L, Lambertenghi R, Ready D, Suvan J, Griffiths GS, et al. Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2014 Nov;41(11):1080-9. doi: 10.1111/jcpe.12299.

Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*. 2012 Dec;27(6):409-19. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x.

Hajishengallis G, Lamont RJ. Dancing with the Stars: How Choreographed Bacterial Interactions Dictate Nososymbiocity and Give Rise to Keystone Pathogens, Accessory Pathogens, and Pathobionts. *Trends Microbiol*. 2016 Jun;24(6):477-489. doi: 10.1016/j.tim.2016.02.010.

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

Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009 Sep;54 Suppl 1:S11-26. doi: 10.1111/j.1834-7819.2009.01140.x.

Hwang WC, Bakolitsa C, Punta M, Coggill PC, Bateman A, Axelrod HL, et al. LUD, a new protein domain associated with lactate utilization. *BMC Bioinformatics*. 2013 Nov 26;14:341. doi: 10.1186/1471-2105-14-341.

Inoue T, Shingaki R, Sogawa N, Sogawa CA, Asaumi J, Kokeguchi S, et al. Biofilm formation by a fimbriae-deficient mutant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiol Immunol*. 2003;47(11):877-81. doi: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb03454.x.

Ioannou AL, Kotsakis GA, Hinrichs JE. Prognostic factors in periodontal therapy and their association with treatment outcomes. *World J Clin Cases*. 2014 Dec 16;2(12):822-7. doi: 10.12998/wjcc.v2.i12.822.

Jepsen K, Jepsen S. Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontol 2000*. 2016 Jun;71(1):82-112. doi: 10.1111/prd.12121.

Jhinger N, Kapoor D, Jain R. Comparison of Periochip (chlorhexidine gluconate 2.5 mg) and Arestin (Minocycline hydrochloride 1 mg) in the management of chronic periodontitis. *Indian J Dent.* 2015 Jan-Mar;6(1):20-6. doi: 10.4103/0975-962X.151697.

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Jun 22;3:17038. doi: 10.1038/nrdp.2017.38.

Könönen E, Müller HP. Microbiology of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2014 Jun;65(1):46-78. doi: 10.1111/prd.12016.

Kumar AJ, Ramesh Reddy BV, Chava VK. Effect of chlorhexidine chip in the treatment of chronic periodontitis. *J Nat Sci Biol Med.* 2014 Jul;5(2):268-72. doi: 10.4103/0976-9668.136159.

Kunihira DM, Caine FA, Palcanis KG, Best AM, Ranney RR. A clinical trial of phenoxymethyl penicillin for adjunctive treatment of juvenile periodontitis. *J Periodontol.* 1985 Jun;56(6):352-8. doi: 10.1902/jop.1985.56.6.352.

Leszczyńska A, Buczek P, Buczek W, Pietruska M. Periodontal pharmacotherapy - an updated review. *Adv Med Sci.* 2011;56(2):123-31. doi: 10.2478/v10039-011-0044-9.

Lu HK, Chei CJ. Efficacy of subgingivally applied minocycline in the treatment of chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2005 Feb;40(1):20-7. doi: 10.1111/j.1600-0765.2004.00763.x.

Mandell RL, Tripodi LS, Savitt E, Goodson JM, Socransky SS. The effect of treatment on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol.* 1986 Feb;57(2):94-9. doi: 10.1902/jop.1986.57.2.94.

Martinez-Canut P, Llobell A. A comprehensive approach to assigning periodontal prognosis. *J Clin Periodontol.* 2018 Apr;45(4):431-9. doi: 10.1111/jcpe.12857.

Meyer DH, Fives-Taylor PM. Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun.* 1994 Mar;62(3):928-35. doi: 10.1128/iai.62.3.928-35.1994.

Mühlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta.* 1971 Oct;15(2):107-13.

Noyan U, Yilmaz S, Kuru B, Kadir T, Acar O, Büğet E. A clinical and microbiological evaluation of systemic and local metronidazole delivery in adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1997 Mar;24(3):158-65. doi: 10.1111/j.1600-051x.1997.tb00485.x.

Oettinger-Barak O, Dashper SG, Catmull DV, Adams GG, Sela MN, Machtei EE, et al. Antibiotic susceptibility of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 in a biofilm. *J Oral Microbiol.* 2013 May 8;5. doi: 10.3402/jom.v5i0.20320.

Ofengand J. Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett.* 2002 Mar 6;514(1):17-25. doi: 10.1016/s0014-5793(02)02305-0.

Pietruska M, Paniczko A, Waszkiel D, Pietruski J, Bernaczyk A. Efficacy of local treatment with chlorhexidine gluconate drugs on the clinical status of periodontium in chronic periodontitis patients. *Adv Med Sci.* 2006;51 Suppl 1:162-5.

Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005 Nov 19;366(9499):1809-20. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67728-8.

Ram-Mohan N, Meyer MM. Comparative Metatranscriptomics of Periodontitis Supports a Common Polymicrobial Shift in Metabolic Function and Identifies Novel Putative Disease-Associated ncRNAs. *Front Microbiol.* 2020 Apr 9;11:482. doi: 10.3389/fmicb.2020.00482. PMID: 32328037; PMCID: PMC7160235.

Rooney J, Wade WG, Sprague SV, Newcombe RG, Addy M. Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxycillin alone and combined. A placebo controlled study. *J Clin Periodontol.* 2002 Apr;29(4):342-50. doi: 10.1034/j.1600-051x.2002.290410.x.

Rose JE, Meyer DH, Fives-Taylor PM. Aae, an autotransporter involved in adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun.* 2003 May;71(5):2384-93. doi: 10.1128/IAI.71.5.2384-2393.2003.

Saxén L, Asikainen S. Metronidazole in the treatment of localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1993 Mar;20(3):166-71. doi: 10.1111/j.1600-051x.1993.tb00339.x. PMID: 8450081.

Schauer R, Kamerling JP. Exploration of the Sialic Acid World. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 2018;75:1-213. doi: 10.1016/bs.accb.2018.09.001.

Sigus B, Beier M, Klinger G, Pfister W, Glockmann E. A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol.* 2001 Mar;72(3):275-83. doi: 10.1902/jop.2001.72.3.275..

Slots J, Bragd L, Wikström M, Dahlén G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol.* 1986 Jul;13(6):570-7. doi: 10.1111/j.1600-051x.1986.tb00849.x.

Slots J; Research, Science and Therapy Committee. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol*. 2004 Nov;75(11):1553-65. doi: 10.1902/jop.2004.75.11.1553. PMID: 15633334.

Stepanović S, Tosić T, Savić B, Jovanović M, K'ouas G, Carlier JP. Brain abscess due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *APMIS*. 2005 Mar;113(3):225-8. doi: 10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130312.x. PMID: 15799768.

Takamatsu N, Yano K, He T, Umeda M, Ishikawa I. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol*. 1999 Jun;70(6):574-80. doi: 10.1902/jop.1999.70.6.574.

Tan KS, Song KP, Ong G. Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Occurrence and association with periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2002 Aug;37(4):268-72. doi: 10.1034/j.1600-0765.2002.01618.x.

van Winkelhoff AJ, Rodenburg JP, Goené RJ, Abbas F, Winkel EG, de Graaff J. Metronidazole plus amoxycillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1989 Feb;16(2):128-31. doi: 10.1111/j.1600-051x.1989.tb01626.x.

Wang CY, Wang HC, Li JM, Wang JY, Yang KC, Ho YK, et al. Invasive infections of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010 Dec;43(6):491-7. doi: 10.1016/S1684-1182(10)60076-X.

Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2001 Apr;28(4):296-305. doi: 10.1034/j.1600-051x.2001.028004296.x.

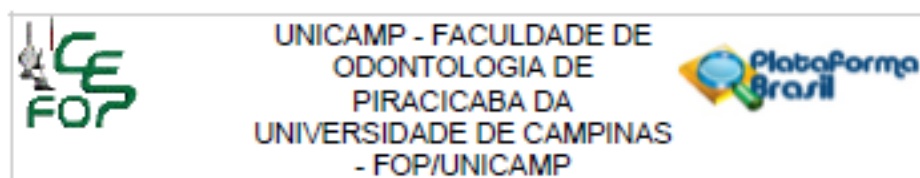
Zambon JJ, Haraszthy VI, Hariharan G, Lally ET, Demuth DR. The Microbiology of Early-Onset Periodontitis: Association of Highly Toxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Strains With Localized Juvenile Periodontitis. *J Periodontol*. 1996 Mar;67 Suppl 3S:282-90. doi: 10.1902/jop.1996.67.3s.282.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

AVALIAÇÃO DO PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DO A. Actinomyces comitans APÓS O TRATAMENTO PERIODONTAL EM PACIENTES COM PERIODONTITE GRAU C			
RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE			
15%	13%	2%	4%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS
FONTES PRIMÁRIAS			
1	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno		4%
2	teses.usp.br Fonte da Internet		4%
3	inpn.com.br Fonte da Internet		2%
4	prppg.ufpel.edu.br Fonte da Internet		1%
5	docplayer.com.br Fonte da Internet		1%
6	repositorio.unesp.br Fonte da Internet		1%
7	repositorio.ufmg.br Fonte da Internet		1%
8	sistema.atenaeditora.com.br Fonte da Internet		1%

Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização do perfil transcriptômico do biofilme subgengival de pacientes em diferentes condições periodontais e peri-implantar

Pesquisador: GABRIELA MARTIN BONILHA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 51169721.8.0000.5418

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.010.640

Apresentação do Projeto:

O parecer inicial é elaborado com base na transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo na Plataforma Brasil e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. Os pareceres de retorno, emendas e notificações são elaborados a partir do último parecer e dos dados e arquivos da última versão apresentada. A EQUIPE DE PESQUISA citada na capa do projeto de pesquisa inclui GABRIELA MARTIN BONILHA (Cirurgiã Dentista, Mestranda no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP, Pesquisadora responsável), HÉLVIS ENRI DE SOUSA PAZ (Cirurgiã Dentista, Doutorando no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), BIANCA CARVALHO MENDES (Cirurgiã Dentista, Mestranda no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), RENATO CORRÊA VIANA CASARIN (Cirurgiã Dentista, Docente na área de Periodontia da FOP-UNICAMP), MATHEUS PASCHOALETTO LOPES (Graduando no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP) e JOÃO VITOR SAMOGIN (Graduando no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP), o que é confirmado na declaração dos pesquisadores e na PB.

DELINEAMENTO DA PESQUISA: Trata-se de estudo clínico, observacional, transversal, comparativo, que envolverá 75 indivíduos, com idade entre 18 e 35 anos, igualmente distribuídos por sexo, alocados em cinco grupos específicos quanto à situação periodontal: Grupo Periodontite Grau A/B, Grupo Periodontite grau C associado ao fumo, Grupo Peri-implante, Grupo Periodontite grau C

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52
 Bairro: Areião CEP: 13.414-903
 UF: SP Município: PIRACICABA
 Telefone: (19)2106-5349 Fax: (19)2106-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br

Anexo 3 – Iniciação Científica



Universidade Estadual de Campinas
Pró-Reitoria de Pesquisa
Programas de Iniciação Científica e Tecnológica
www.prp.unicamp.br | Tel. 55 19 3521-4891

PARECER SOBRE RELATÓRIO PARCIAL DE ATIVIDADES

Bolsista: MATHEUS PASCHOALETTO LOPES - RA 197513

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) RENATO CORREA VIANA CASARIN

Projeto: "AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE DIFERENTES CONDIÇÕES PERIODONTAIS NA MICROBIOTA INTESTINAL"

Bolsa: PIBIC/CNPq

Processo: 134280/2021-0

Vigência: 01/09/2020 a 31/08/2021

PARECER

O relatório apresentado pelo bolsista Matheus Paschoaletto Lopes relata as atividades desenvolvidas para execução do projeto "Avaliação do perfil transcriptômico do *A. actinomycetemcomitans* após o tratamento periodontal em pacientes com periodontite grau C² durante a vigência da bolsa. O bolsista se dedicou ao projeto de pesquisa resultando num trabalho bem estruturado, com resultados coerentes com o projeto, os quais foram discutidos entre si e com a literatura. Além disso, apresentou bom desempenho acadêmico, cumprindo as obrigações curriculares.

Conclusão do Parecer:

● Aprovado

Pró-Reitoria de Pesquisa, 12 de setembro de 2021.

Marcos Yakuwa Mekarú

PR ASS ADMINISTRATIVOS / TÉCNICO EM
ADMINISTRAÇÃO
(Assinatura Digital em anexo)

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código 48798AD0 B63D42C1 B8B11CCA E835F820

Documento assinado eletronicamente por Marcos Yakuwa Mekarú, PR ASS ADMINISTRATIVOS / TÉCNICO EM ADMINISTRAÇÃO, em 13/10/2021, às 10:03 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
48798AD0 B63D42C1 B8B11CCA E835F820

