

TIAGO TAIETE

**ABORDAGENS MOLECULARES PARA
DIAGNÓSTICO EM PERIODONTIA:
o papel do conhecimento “ômico”**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, como requisito para obtenção do Título de Especialista em Periodontia.

Piracicaba

2013

TIAGO TAIETE

Cirurgião Dentista

**ABORDAGENS MOLECULARES PARA
DIAGNÓSTICO EM PERIODONTIA:
o papel do conhecimento “ômico”**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, como requisito para obtenção do Título de Especialista em Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati

Piracicaba

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Taiete, Tiago, 1987-

T131a Abordagens moleculares para diagnóstico em periodontia:
o papel do conhecimento “ômico” / Tiago Taiete. -- Piracicaba,
SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Márcio Zaffalon Casati.

Trabalho de Conclusão de Curso (especialização) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Genomas. 2. Transcriptoma. 3. Proteoma. 4.
Metaboloma. I. Casati, Márcio Zaffalon, 1973- II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. III. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, **Orlando Taíete** e **Valéria Aparecida Giacomini Taíete**, minha eterna gratidão, pelo amor incondicional e carinho recebido durante toda a minha vida. Em todos os momentos estiveram presentes, incentivando-me e reconfortando-me. Ensinarão-me com seus exemplos a ter responsabilidade, tolerância e honestidade, valores essenciais para trilhar minha vida de maneira digna.

Ao meu estimado irmão **Ricardo Taíete**, meu grande amigo e companheiro. Seu espírito de luta e honra me ajudaram a crescer pessoal e profissionalmente. Sou eternamente grato pelos seus incentivos e por sua amizade.

A minha querida e amada **Maria Alice Gatti Palma**, exemplo de carinho e compreensão, sempre me motivando a crescer e me reconfortando nos momentos difíceis.

Com carinho,

Dedico

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por sua presença constante em minha vida, ajudando a superar cada obstáculo que encontrei.

Ao **Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati**, meu orientador de estágio, de especialização e de mestrado, por abrir as portas da periodontia para mim. Obrigado por me ensinar a ser um profissional melhor e mais crítico, tanto como especialista assim como pesquisador.

Aos professores do curso de especialização **Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum, Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum, Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior, Prof^a. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz, Prof. Edwil Cantadori Júnior e Prof. Vinicius de Moraes**. Obrigado pelos ensinamentos e por dividirem suas experiências clínicas que foram fundamentais na minha formação como especialista em periodontia.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, da Universidade Estadual de Campinas, minha segunda casa há sete anos. Agradeço a todos os professores da FOP/UNICAMP que participaram da minha formação, por permitirem que um garoto com muitos sonhos e nenhuma experiência se tornasse um cirurgião-dentista, e depois especialista e mestre em periodontia.

Ao meu amigo **Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casasin**, pelos incontáveis momentos de ajuda, orientação e também pelos inúmeros momentos de descontração.

Ao **Hugo Felipe do Vale, Lucas Alves Moura e Lucas de Araújo Queiroz** pela amizade e por todo o incentivo para me tornar um profissional melhor.

Aos amigos e colegas de especialização: **Camila Coser Guinone, Carolina Barbosa, Daniela Bordin, Evely Sartori da Silva, Igor Pena Andrade, Isabela Lima França, Julia Gimenes, Juliana Miranda, Maria Alice Gatti Palma,**

Mayra Laino Albiero e Mayra Mello. Obrigado pelo agradável convívio, por todas as ajudas e informações trocadas.

À **Mayra Laino Albiero**, minha dupla da especialização, pelos incontáveis auxílios nas cirurgias e por permitir aprender um pouco mais com seus casos clínicos.

À **Regina Célia Corrêa Caetano da Silva**, que sempre esteve disposta a me ajudar. Obrigado pela paciência e bom-humor no dia a dia.

Aos amigos da periodontia: **Ana Paula Giorgetti Bossolan, Ana Regina Oliveira Moreira, Bruna Rabelo Amorim, Cristiane Ribeiro Salmon, Mabelle de Freitas Monteiro, Mauro Pedrine Santamaria, Miki Taketomi Saito, Mirella Lindoso Gomes Campos, Mônica Grazieli Corrêa.** Obrigado pelos bons momentos vividos, trocas de informações e incontáveis ajudas.

Aos meus amigos desde a graduação **Alexssandra Shizue Iwamoto, Larissa Bortoletto Miyata, Marcos Jaquinta Wood, Miquéias de Oliveira Lima Fernandes, Pedro Augusto Thiene Leme, Rivaldo Carneiro Firmino Filho, Rodolfo Alberto Pires de Camargo, Vinícius Brito Silva, Vinícius Henrique Alves Ferreira e Vinícius Luiz Rodrigues Podadera.** As pessoas aparecem na nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem. Obrigado pela amizade, apoio e momentos de descontração nesses 7 anos de convívio.

Aos meus familiares, em especial aos meus avós **Arlindo Giacomini e Zulmira Parazzi Giacomini**, e meus sogros **Ana Maria Gatti Palma e Carlos Eduardo Palma**, que sempre acreditaram em mim e por toda alegria em nossa convivência.

E finalmente as pessoas mais importantes da minha vida:

Aos meus pais **Orlando e Valéria**, e meu irmão **Ricardo**, serei eternamente grato por acreditarem e lutarem por mim, dando toda a estrutura financeira e psicológica para que meus sonhos se tornassem realidades. Obrigado por me ensinarem com seus exemplos a batalhar para alcançar meus objetivos, a

ser responsável, dedicado, educado e ético no trabalho e nas relações pessoais. Obrigado por todo amor e carinho no nosso dia-a-dia. Talvez não existam palavras para agradecer tudo o que vocês me proporcionaram, mas podem ter certeza que nada conseguiria sem o apoio e dedicação de vocês.

À **Maria Alice**, por toda a felicidade, segurança, equilíbrio e paz que tenho ao estar ao seu lado. Tenho muito orgulho do seu esforço diante das dificuldades, da sua capacidade em aprender, e de suas habilidades como profissional. Obrigado por compartilhar comigo cada minuto que convivemos e que iremos viver. Obrigado pela compreensão e paciência nos dias que fiquei ausente dedicando-me ao trabalho, e quando juntos pelo amor e carinho. Obrigado, por permitir construir a minha vida e meu futuro ao lado de quem eu amo.

EPÍGRAFE

“Em um determinado dia, em uma determinada circunstância, você acha que tem um limite. Logo que você toca esse limite alguma coisa acontece e você pode ir um pouco mais além. Com o poder da sua mente, sua determinação, seu instinto e a sua experiência você pode voar muito alto!”

Ayrton Senna

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. DESENVOLVIMENTO	14
2.1. GENÔMICA	14
2.2. TRANSCRIPTÔMICA	15
2.3. PROTEÔMICA.....	17
2.4. METABOLÔMICA.....	20
2.5. BIOLOGIA SISTÊMICA (SYSTEMS BIOLOGY).....	21
3. CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

RESUMO

As doenças periodontais são altamente complexas e possuem etiologia multifatorial, com a participação de inúmeros mecanismos biológicos. Esta revisão tem por objetivo discutir alguns dos avanços nas pesquisas científicas que utilizam métodos de biologia molecular para avaliar os aspectos da genômica, proteômica, transcriptômica e metabolômica da doença periodontal. Diversos estudos na literatura demonstram que essas ferramentas podem promover uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese e na identificação de novos biomarcadores das doenças periodontais, que podem ser utilizados testes diagnósticos futuros para detectar a presença de doença ativa, prever progressão futura e avaliar a resposta a terapia periodontal.

Palavras-chave:

Periodontite; Genoma; Transcriptoma; Proteoma; Metaboloma.

ABSTRACT

Periodontal diseases are highly complex and have multifactorial etiology processes with the participation of several biological mechanisms. This review sought to discuss some of the advances in scientific research that use molecular biology methods to address the aspects of genomic, proteomic, transcriptomic, and metabolomic of periodontal diseases. Several studies in the literature show that these tools aim to promote a better understanding of the mechanisms involved in the pathogenesis and identification of new biomarkers of periodontal diseases that may be used in future diagnostic tests to detect the presence of active disease, predict future progression, and evaluate the response to periodontal therapy.

Key-words:

Periodontitis; Genome; Transcriptome; Proteome; Metabolome.

1. INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória de etiologia multifatorial, caracterizada pela destruição óssea e perda de inserção conjuntiva, constituindo uma das principais causas da perda de elementos dentários em adultos (Feng & Weinberg, 2006; Sørensen *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2009). A destruição do suporte periodontal, em sua maior parte, é resultado da resposta imune-inflamatória do hospedeiro aos periodontopatógenos, que pode ser influenciada por fatores genéticos, ambientais e comportamentais (Quirynen *et al.*, 2001; Armitage, 2002; Socransky & Haffajee, 2005; Schäfer *et al.*, 2011).

Embora os avanços científicos nas últimas décadas permitiram uma melhor compreensão da etiologia e progressão das doenças, os mecanismos envolvidos na patologia de inúmeras doenças complexas, como as periodontites, ainda não são completamente entendidos (Burke, 2003; Craig, 2008). Por exemplo, a periodontite crônica e a periodontite agressiva aparentemente possuem os mesmos fatores etiológicos, entretanto, elas apresentam diferenças significativas no desenvolvimento e progressão (Tonetti & Mombelli, 1999). Enquanto a periodontite crônica apresenta uma progressão lenta, usualmente compatível com os fatores locais, a periodontite agressiva é definida como uma doença inflamatória de início precoce, acometendo geralmente indivíduos jovens, caracterizada pela rápida perda de inserção e destruição óssea (Armitage, 1999). Visando uma melhor compreensão dos fatores envolvidos na patogênese destas doenças e tentando explicar possíveis diferenças entre as formas crônica e agressiva da periodontite, aspectos microbiológicos, imunológicos e genéticos têm sido estudados; entretanto os mecanismos responsáveis por essas diferenças ainda não foram completamente explicados (Kinane *et al.*, 1999; Armitage, 2002; Casarin *et al.*, 2010).

Além disso, há evidência que tanto a periodontite crônica como a periodontite agressiva não representem uma entidade patológica única, mas sim fenótipos semelhantes de mecanismos patológicos diferentes (Armitage, 2002; Dentino *et al.*, 2013). Contudo, os parâmetros clínicos utilizados atualmente para o diagnóstico das doenças periodontais, tais como profundidade de bolsa e sangramento a sondagem, são reflexos pobres da patogênese das diferentes formas

de periodontites, e não são específicas e seguras/confiáveis para diagnóstico (Armitage, 2004; Taba *et al.*, 2005; Demmer *et al.*, 2008). Nesse sentido, alguns estudos tentaram identificar algumas características indicativas do status dos processos patogênicos com grande acurácia, i.e., biomarcadores. Esses biomarcadores podem ser utilizados para facilitar o diagnóstico precoce das fases ativas das doenças periodontais e a identificação de pacientes de risco para futuro desenvolvimento da doença (de Souza & Taba, 2004; Taba *et al.*, 2005; Demmer *et al.*, 2008).

Biomarcadores são definidos pelo National Institutes of Health (NIH, USA) como “uma característica que é mensurada objetivamente e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos, resposta farmacológica a intervenções terapêuticas”. Bensalah *et al.* (2007) reportou que podem ser diferenciados seis tipos de biomarcadores:

- detecção precoce da doença;
- diagnóstico da presença ou ausência da doença;
- prognóstico da doença e estratificação dos pacientes, permitindo intervenções terapêuticas personalizadas;
- predição do resultado do tratamento;
- identificação dos pacientes que responderam adequadamente a determinado tratamento; e
- desfechos substitutos.

Segundo Loos & Tjoa (2005) em periodontia os biomarcadores devem: detectar um caso de periodontite, isto é, distinguir periodontite de saúde e gengivite; classificar a periodontite em crônica ou agressiva; permitir o planejamento do tipo adequado e a extensão do tratamento; e por último monitorar os pacientes tratados, para adaptar a terapia periodontal de suporte as necessidades biológicas dos pacientes.

Além dessas características, para um biomarcador ou um grupo de biomarcadores serem empregados com sucesso na prática clínica, eles devem ser objetivos, reproduzíveis, de fácil utilização, de baixo custo, e com grande sensibilidade, especificidade e acurácia quando comparado aos testes diagnósticos existentes (Grant, 2012). Os potenciais biomarcadores idealmente deveriam ser avaliados e validados em diversas etapas, de maneira semelhante às etapas requeridas para liberação de um fármaco (figura 1) (Grant *et al.*, 2012).

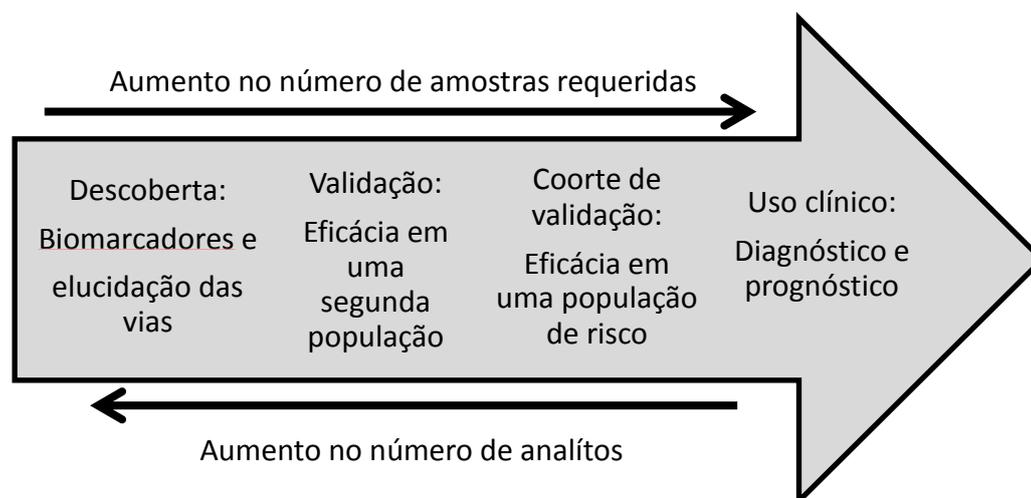


Figura 1. Etapas de avaliação necessárias para a descoberta de biomarcadores.

Muito dos agentes envolvidos na patogênese das doenças periodontais, incluindo substâncias derivadas do hospedeiro (tais como citocinas, enzimas, anticorpos, e produtos da degradação tecidual) e/ou fatores microbianos (periodontopatógenos no ambiente subgengival), podem ser identificadas em diferentes níveis (dependendo do tipo, severidade e atividade da doença) no fluído crevicular gengival, saliva e tecido gengival (Taba *et al.*, 2005). Todos eles podem ser considerados potenciais biomarcadores. De acordo com Taba *et al.* (2005) existem diversas ferramentas para medir as doenças periodontais a nível molecular, celular e tecidual, incluindo PCR (reação da polimerase em cadeia), hibridização de DNA-DNA, ensaio imunoenzimático entre outros. Contudo, até o presente momento, não há nenhum indicador baseado nessas técnicas em periodontia (Uitto, 2003).

Com os avanços na pesquisa científica e o desenvolvimento de novas técnicas que permitiram o estudo da genômica, transcriptômica, proteômica e a metabolômica, o entendimento dos mecanismos envolvidos no início e na progressão envolvidos na doença periodontal tem aumentado, possibilitando assim a identificação de biomarcadores das doenças periodontais (Taba *et al.*, 2005; Kormman, 2008). Nesse sentido, este trabalho resume alguns dos avanços na pesquisa utilizando as técnicas de biologia molecular, para se avaliar os aspectos da genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica da doença periodontal para avaliar as características do hospedeiro. Essas técnicas podem eventualmente levar ao desenvolvimento de novos testes diagnósticos para as doenças periodontais.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. GENÔMICA

A genômica se refere ao estudo do genoma de um organismo, isto é, de todo o DNA de um organismo. Os avanços tecnológicos na avaliação do genoma, como a melhoria no sequenciamento de DNA, microarray de polimorfismos, e estudos de associação genômica (genome-wide association study – GWAS), permitiram a avaliação de centenas a milhares de genes e suas associações com os eventos relacionados as doenças (Burke, 2003; Schäfer *et al.*, 2011). Seu desenvolvimento tem o potencial de mudar a prática das ciências da saúde, entre elas a odontologia (Giacomelli & Covani, 2010; Grant, 2012).

A principal variação genética é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs -single nucleotide polymorphisms), que pode afetar a expressão do gene ou as funções da proteína produzida (Takashiba & Naruishi, 2006). Em periodontia, por algum tempo, os estudos genéticos avaliaram a relação entre a presença de polimorfismos em genes pré-selecionados de citocinas, receptores de imunoglobulinas, antígenos leucocitários humanos (HLA), entre outros e o risco de desenvolvimento e a severidade das periodontites, bem como o resultado do tratamento periodontal (Takashiba & Naruishi, 2006; Grant, 2012).

Muitos estudos reportaram uma associação positiva entre polimorfismo do gene da interleucina-1 (IL-1) e a doença periodontal. Kornman *et al.* (1997) encontraram uma associação positiva entre polimorfismos dos genes codificadores da IL-1 α (-889) e da IL-1 β (+3953) e aumento da severidade da periodontite, com outros estudos mostrando resultados similares. Gore *et al.* (1998) também relataram uma possível associação do polimorfismos dos genes da IL-1 α e IL-1 β na susceptibilidade a periodontite do adulto. Por outro lado, Papapanou *et al.* (2001) em um estudo que envolveu 132 pacientes com periodontite, e indivíduos controles pareados para idade e sexo, não demonstraram qualquer associação entre polimorfismo da IL-1 e doença periodontal. Enquanto Meisel *et al.* (2002) demonstraram que apenas os indivíduos que eram genótipo positivo e que eram tabagistas tinham risco aumentado para periodontite.

Em 2010 Schäfer *et al.* publicaram o primeiro estudo de associação genômica em periodontia. Nesse estudo, os autores examinaram 500.568 potenciais

polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em 141 pacientes com periodontite agressiva generalizada, e 142 pacientes com periodontite agressiva localizada independentemente, e identificaram 197 e 244 potenciais SNPs, respectivamente. Contudo, quando os dois grupos foram avaliados em conjunto, apenas um SNP rs1537415 localizado dentro do intron 2 do gene GLT6D1 permaneceu significativo, o que foi subsequentemente validado em um terceiro conjunto de pacientes. O gene GLT6D1 codifica uma enzima transmembrana da família 6 das glicosiltransferases. Essas enzimas contribuem para a síntese de antígenos teciduais e sanguíneos no complexo de Golgi. Esse gene é expresso em leucócitos e no tecido conjuntivo gengival e pode influenciar a resposta imune.

Visando uma melhor compreensão das interações entre o hospedeiro e os periodontopatógenos, Divaris *et al.* (2012) realizaram um estudo de associação genômica e a colonização com patógenos periodontais, em 1020 indivíduos brancos, e em uma segunda etapa para validar os resultados em 123 indivíduos afro-americanos. Nos indivíduos brancos foram encontrados 13 polimorfismos (incluindo em genes envolvidos na expressão da metaloproteinase da matriz 13, adesão e migração de macrófagos e produção de interleucina-33) com evidência sugestiva para colonização em altos níveis das bactérias dos complexos vermelho e laranja, e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Essas associações, com exceção para o Aa, também foram encontradas nos indivíduos afro-americanos.

Atualmente, embora algumas associações entre polimorfismos e a doença periodontal foram identificadas, existe uma limitação para a maioria dos genes estudados (Kinane & Hart, 2003; Schäfer *et al.*, 2011). Estudos futuros, bem delineados e que empreguem técnicas de alta resolução (por exemplo, estudos de associação genômica), em um grande número de pacientes e de indivíduos controles podem fornecer mais associações e melhores evidências. Portanto, aumentando o entendimento da patogênese das doenças, facilitando o diagnóstico e a estratificação dos pacientes de acordo com o risco de desenvolvimento da periodontite (Schäfer *et al.*, 2011; Grant, 2012; Sleiman & Termatchi, 2013).

2.2. TRANSCRIPTÔMICA

O transcriptoma é definido como o estudo do conjunto de todos os RNAs transcritos de uma célula ou tecido em uma condição particular, também conhecido

como perfil de expressão gênica (Kebuschull & Papapanou, 2010). O estudo do perfil de expressão gênica pode aumentar a compreensão dos eventos envolvidos no desenvolvimento da periodontite (Giacomelli & Covani, 2010; Kebuschull & Papapanou, 2010). Esta forma de avaliação proporcionou informações importantes na área médica, particularmente nas pesquisas de câncer (Quackenbush, 2006), distrofia muscular (Haslett & Kunkel, 2002), doença de Alzheimer e demência (Colangelo *et al.*, 2002), entre outras doenças. A tecnologia do microarranjo de DNA (DNA microarray) é o método mais utilizado na atualidade para a obtenção do perfil de expressão gênica (Wang *et al.*, 2003), e pode ser realizado para investigar desde grupos de genes com funções específicas, variando de poucos genes, até mais de 22000 a 44000 transcritos, o que abrange todo transcriptoma.

Nesse contexto, alguns estudos avaliaram o perfil de expressão gênica de tecido gengival e de monócitos e linfócitos da circulação periférica de pacientes com periodontite. Sørensen *et al.* (2008) avaliaram o transcriptoma de monócitos e linfócitos de pacientes com periodontite agressiva localizada (PAL) e generalizada (PAG), em comparação com indivíduos saudáveis (controles). Nos pacientes com PAL 53 genes tiveram expressão alterada em comparação ao controle, sendo que 14 desses genes tinham funções na resposta imune. Já os pacientes com PAG apresentaram um perfil de expressão gênica mais próximo dos indivíduos saudáveis, com apenas 3 genes com expressão alterada, indicando uma condição mais heterogênea.

Em um estudo piloto, Papapanou *et al.* (2004) relataram que foi possível separar os pacientes com periodontite através do perfil de expressão gênica do tecido gengival inflamado em dois grupos, independentemente do diagnóstico clínico (crônica ou agressiva). Esses grupos apresentavam parâmetros clínicos e microbiológicos similares, entretanto diferiram significativamente quanto aos níveis séricos de IgG contra os periodontopatógenos *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Campylobacter rectus*. Interessantemente, o diagnóstico diferencial entre periodontite crônica e agressiva não foi possível de ser realizado nesse estudo.

Demmer *et al.* (2008) avaliaram a expressão gênica de tecido gengival inflamado adjacente a bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica e agressiva, em comparação a tecidos gengivais de sítios saudáveis. Inúmeros genes (12744 ao todo), incluindo genes envolvidos na apoptose, resposta humoral, apresentação de antígeno e angiogênese, foram diferencialmente expressos nos

tecidos inflamados e saudáveis. Essa expressão gênica alterada por ser influenciada pela composição da microbiota da bolsa periodontal, como observado por Papapanou *et al.* (2009). Neste estudo, a análise do efeito dos periodontopatógenos na expressão gênica do tecido gengival demonstrou que a expressão de determinados genes são correlacionadas ao tipo e carga microbiana, modulando de alguma maneira a patogênese da doença. Contudo as vias dessas relações não são completamente conhecidas.

Avaliando possíveis fatores que influenciam na resposta ao tratamento periodontal, Kim *et al.* (2006) mostraram que 68 genes foram positivamente e 6 genes foram negativamente modulados nos tecidos gengivais de sítios com periodontite refratária, em comparação com indivíduos que responderam adequadamente ao tratamento periodontal. A maior parte desses genes possuíam funções imune-inflamatórias. Deste modo, Beikler *et al.* (2008) investigaram as mudanças na expressão gênica no tecido gengival de bolsas residuais ≥ 7 mm, após uma sessão de tratamento periodontal em pacientes com periodontite crônica. Os autores encontraram que o tratamento periodontal promove uma forte redução da expressão da resposta imune-inflamatória, e ativa as vias associadas ao reparo tecidual. Esses genes diferencialmente expressos, portanto, podem ser alvos de novas estratégias de diagnóstico e tratamento, podendo ainda explicar a resposta clínica negativa de algumas condições periodontais.

Em resumo, tem sido postulado que diferentes padrões de expressão gênica podem definir condições periodontais com diferentes implicações clínicas. Contudo, mais estudos são necessários para elucidar a real aplicação dessa abordagem (Offenbacher *et al.*, 2007; Kormman, 2008). A informação completa do perfil de expressão gênica dos tecidos afetados pela doença, que pode ser influenciado por características genéticas e constitutivas dos indivíduos, composição da microbiota, fatores ambientais, entre outros fatores modificadores, pode fornecer detalhes das redes moleculares envolvidas na periodontite, possibilitando concomitantemente o desenvolvimento de novas abordagens preventivas e terapêuticas (Hood *et al.*, 2004; Kormman, 2008).

2.3. PROTEÔMICA

O objetivo da proteômica é identificar, quantificar, analisar a localização e as interações do conjunto de proteínas expressas em uma célula, tecido ou fluido em condições de doença e/ou saúde (Garcia & Tabak, 2008). A proteômica pode levar a uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos moleculares das doenças orais (Giacomelli & Covani, 2010), e pode assumir grande importância durante o diagnóstico, uma vez que as proteínas são os principais componentes funcionais dos sistemas bioquímicos, e podem ser alvos celulares para agentes terapêuticos (Agrawal *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da proteômica foi possível devido aos avanços na espectrometria de massa e nas técnicas de separação, incluindo eletroforese e técnicas de separação de proteínas livre de gel, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), quantificação através da marcação das proteínas por tags isobáricas no iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation), e a detecção de proteínas por fluorescência (Tyers & Mann, 2003; Grant *et al.*, 2010).

Alguns estudos demonstraram que o perfil de proteínas presentes na saliva é associado com algumas patologias orais, como periodontite crônica e agressiva, líquen plano e câncer bucal (Gonçalves *et al.*, 2011). Wu *et al.* (2009) investigaram o proteoma da saliva de pacientes com periodontite agressiva generalizada em comparação com indivíduos saudáveis. Nesse estudo 11 proteínas foram detectadas em diferentes níveis, sendo que os anticorpos IgG2 e IgGA2 apresentaram altos níveis na saliva dos pacientes com periodontite agressiva, enquanto a proteína lactoferrina, que inibe o crescimento bacteriano, foi encontrada em baixos níveis. Ao avaliar as mudanças no proteoma salivar após o tratamento periodontal, Haigh *et al.* (2010) demonstraram que 11 proteínas possuíam maior concentração nos indivíduos com doença ativa, enquanto 4 proteínas demonstraram baixos níveis. A grande maioria dessas proteínas estava associada com os processos de defesa imune.

O conteúdo do fluido crevicular gengival também pode ser avaliado por métodos proteômicos, indicando uma análise mais local da doença periodontal, isto é, da bolsa periodontal. Kojima *et al.* (2000), através de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, avaliaram as proteínas presentes no fluido crevicular de pacientes com periodontite. Os autores reportaram que os sítios com doença periodontal e os sítios saudáveis apresentaram um padrão distinto de proteínas, com

a presença de duas proteínas ligantes de cálcio, calgranulina A (MRP8) e calgranulina B (MRP14) em sítios periodontais. Essas proteínas, que são detectadas em neoplasias e inflamação neurológica, ainda não haviam sido associadas à doença periodontal. Lundy *et al.* (2005) encontraram altos níveis de α -defensinas neutrofílicas no fluido crevicular de indivíduos saudáveis em comparação com sítios com doença periodontal, indicando que em indivíduos saudáveis esses peptídeos podem formar uma linha de defesa contra as agressões da microbiota.

Estudos recentes passaram a empregar técnicas proteômicas de alta resolução na avaliação de proteínas e vias moleculares envolvidas na inflamação gengival. Grant *et al.* (2010) quantificaram as mudanças no perfil do proteoma do fluido crevicular gengival durante a indução e a resolução da gengivite experimental, através da marcação das amostras por tags isobáricas (iTRAQ) e espectrometria de massa com ressonância de íons FTICR (Fourier transform ion cyclotron resonance). Foram identificadas ao todo 186 proteínas humanas e 16 bacterianas durante o período da gengivite experimental, incluindo amostras com propriedades antibacterianas, ligantes de DNA, do citoesqueleto, e associadas com neurônios e sinapses, que foram associadas com mudanças nos parâmetros clínicos. De maneira semelhante, Bostanci *et al.* (2013) avaliaram a expressão sequencial de proteínas presentes no fluido gengival durante gengivite experimental, utilizando cromatografia líquida e espectrometria de massa em tandem. Proteínas envolvidas na resposta imune e com função antimicrobiana, como α -amilases, calgranulina A, cistatinas, lisozima C e catepsina G, foram reguladas positivamente na fase de indução da gengivite. Na fase de resolução diversas histonas e proteínas neutrofílicas como catepsina G, mieloperoxidase e defensina-1 tiveram sua produção diminuída.

A composição do fluido gengival de sítios inflamados de pacientes com periodontite agressiva generalizada foi avaliado por Bostanci *et al.* (2010). A proporção de enzimas associadas com neutrófilos, metaloproteínase da matrix-8, catepsina G, mieloperoxidase, além de proteínas bacterianas, virais e de leveduras estavam aumentadas na periodontite agressiva quando comparados com sítios saudáveis de indivíduos sem periodontite. Enquanto cistatina B e defensinas, proteínas de defesa, foram detectadas apenas em indivíduos saudáveis.

Diferindo das análises de DNA e RNA que são beneficiadas por etapas de amplificação anterior aos procedimentos analíticos, na proteômica isso não é

possível, o que pode dificultar a detecção de proteínas em baixas concentrações. Além disso, muitas vezes é necessária a remoção ou a separação de algumas proteínas que são encontradas em abundância (como a albumina), anteriormente a análise, o que pode levar a perda de informação (Grant, 2012). Apesar dos recentes avanços nas técnicas disponíveis para avaliar o proteoma, melhorias futuras nas metodologias, organização internacional dos projetos de proteoma e acesso aberto aos resultados são necessários para que essa abordagem alcance todo seu potencial.

A análise abrangente do proteoma complementa as outras abordagens “ômicas”, permitindo uma investigação mais detalhada da doença periodontal, com o intuito de descobrir marcadores moleculares em tecido ou fluido de sítios com periodontite. Essa compreensão pode facilitar o entendimento das interações hospedeiro-patógenos, e consequentemente o diagnóstico e o monitoramento da resposta ao tratamento.

2.4. METABOLÔMICA

A metabolômica é a disciplina que monitora a quantidade de todos os metabólitos (macromoléculas), como lipídios, açúcares, aminoácidos, com exceção apenas de DNA, RNA e proteínas, de uma determinada amostra, com o objetivo de entender a dinâmica do metabolismo associado com doenças ou exposição a fármacos (Garcia & Tabak, 2008; Giacomelli & Covani, 2010; Spielmann & Wong, 2011; Grant, 2012). As metodologias para avaliar o metaboloma estão em evolução, contudo, não existe ainda nenhuma técnica que é capaz de analisar todas as estruturas químicas. Portanto, as amostras devem ser analisadas por diversas técnicas, incluindo ressonância nuclear magnética e espectrometria de massa (Grant, 2012).

Em outras áreas a metabolômica proporcionou importantes informações a respeito do diagnóstico, prognóstico e compreensão da patogênese em doenças crônicas e multifatoriais, entre elas doenças cardiovasculares, diabetes e doenças do sistema nervoso central (Tanke, 2007). Assim, é uma técnica promissora para o estudo das doenças periodontais (Garcia & Tabak, 2008), entretanto poucos estudos foram publicados utilizando essa abordagem em periodontia.

Barnes *et al.* (2009) determinaram o perfil do metaboloma do fluído gengival coletado de sítios saudáveis, com gengivite e com periodontite de 22 pacientes com periodontite crônica, através de cromatografia líquida e gasosa associada a espectrometria de massa. A análise permitiu a detecção de 103 metabólitos, sendo que aproximadamente 50% dos metabólitos apresentavam níveis alterados entre as três condições avaliadas. A via da degradação da purina, fonte de produção de espécies reativas de oxigênio, estava significativamente aumentada nos sítios periodontais, indicando que essa via pode ser a principal fonte do estresse oxidativo que ocorre na inflamação periodontal.

Gronert *et al.* (2004) utilizando um tipo especial de metabolômica para avaliação de lipídios, demonstraram uma deficiência na produção de diacilglicerol (DAGK) em neutrófilos de pacientes com periodontite agressiva localizada. Os autores propuseram que o baixo nível dessa molécula pode levar a um aumento na produção de ânions superóxidos, contribuindo para a inflamação periodontal.

A concentração e o fluxo de pequenas moléculas presentes nas células, tecidos, órgãos e fluídos é o resultado de interações complexas entre a expressão de genes e proteínas, sendo influenciadas por fatores ambientais. Os resultados da metabolômica complementam as informações obtidas das outras metodologias ômicas, adicionando importantes informações nas bases biológicas das doenças (Sugimoto *et al.*, 2010).

2.5. BIOLOGIA SISTÊMICA (SYSTEMS BIOLOGY)

A grande quantidade de dados gerados pela genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica requer ferramentas de análise sofisticadas, para extrair a maior parte das informações geradas, permitindo uma melhor caracterização das redes moleculares envolvidas em condições fisiológicas e patológicas (Kormman, 2008; Giacomelli & Covani, 2010). A bioinformática, que é a aplicação da tecnologia da informação no campo da biologia molecular através do desenvolvimento de novos algoritmos, é uma ferramenta fundamental na análise dos dados gerados pelas plataformas 'ômicas' (Giacomelli & Covani, 2010).

Esta abordagem é citada na literatura como Biologia Sistêmica (systems biology em inglês), que é a integração, por programas computacionais, do conjunto de dados gerados pela genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica gerando

informações relevantes para o entendimento das interações que ocorrem em diferentes níveis moleculares de um sistema biológico (Nicholson & Wilson, 2003; Fukushima *et al.*, 2009; Grant, 2012). De acordo com Hood (2004) biologia sistêmica é a disciplina científica que se esforça para quantificar todos os elementos moleculares de um sistema biológico, avaliar suas interações e integrar essas informações criando hipóteses para explicar determinados comportamentos.

A patogênese da periodontite é caracterizada pelo envolvimento de inúmeras vias biológicas (Covani *et al.*, 2008). A identificação e a caracterização de possíveis genes, proteínas e moléculas envolvidas nessas vias, através da integração dos dados das tecnologias ômicas, provavelmente representará um dos marcos para cuidados personalizados no futuro, ao permitir a descoberta de biomarcadores (Giacomelli & Covani, 2010).

Um exemplo dessa abordagem aplicada a periodontia é o estudo de Covani *et al.* (2008), que avaliou 61 genes (reportados em estudos já publicados) potencialmente envolvidos na periodontite. A análise foi realizada por algumas abordagens de bioinformática para prever possíveis “genes líder”, isto é, genes que podem desempenhar importante papel no processo analisado. Os autores reportaram que 5 genes foram identificados como “genes líder” (NFκB1, RELA, PIK3R1, GRB2, e CBL), predominantemente envolvidos na sinalização mediada por receptores do sistema imune-inflamatório.

Os resultados obtidos através das metodologias ômicas, e sua integração por abordagens de bioinformática, permitirão uma melhor compreensão dos eventos que ocorrem na patogênese da doença periodontal, podendo levar a identificação de novos biomarcadores, fatores de risco e alvos terapêuticos.

3. CONCLUSÃO

Em conclusão, existe uma vasta literatura na pesquisa de biomarcadores da doença periodontal. Contudo, ainda não há biomarcadores que possam ser utilizados com precisão na prática clínica. Aperfeiçoamentos nas técnicas de pesquisa como aquelas que empregam as disciplinas “ômicas”, podem levar a um melhor entendimento da doença periodontal. Principalmente ao fornecer uma visão abrangente dos processos de patogênese através da identificação de moléculas e vias envolvidas na mudança da condição de saúde para a doença, e também entre diferentes patologias. Consequentemente, essas técnicas podem ser aplicadas futuramente no diagnóstico das doenças periodontais, através da identificação de um ou mais biomarcadores para a detecção de doença ativa, prever progressão futura e avaliar a resposta à terapia periodontal. Portanto, melhorando o manejo clínico dos pacientes com periodontite através de cuidados personalizados por permitir diagnóstico e intervenção precoce. Contudo, mais pesquisas são necessárias antes que essas ferramentas para diagnóstico tornem-se realidade na prática clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

1. Agrawal P, Sanikop S, Patil S. New developments in tools for periodontal diagnosis. *In Dent J.* 2012; 62(2): 57-64.
2. Armitage GC. Classifying periodontal diseases – a long-standing dilemma. *Periodontol 2000.* 2002; 30: 9-23.
3. Armitage GC. The complete periodontal examination. *Periodontol 2000.* 2004; 34: 22-33.
4. Barnes VM, Teles R, Trivedi HM, Devizio W, Xu T, Mitchell MW *et al.* Acceleration of purine degradation by periodontal diseases. *J Dent Res.* 2009; 88: 851-855.
5. Beikler T, Peters U, Prior K, Eisenacher M, Flemmig TF. Gene expression in periodontal tissues following treatment. *BMC Med Genomics.* 2008; 1: 30-38.
6. Bensalah K, Montorsi F, Shariat SF. Challenges of cancer biomarker profiling. *Eur Urol.* 2007; 52:1601–1609
7. Bostanci N, Heywood W, Mills K, Parkar M, Nibali L, Donos N. Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). *J Proteome Res.* 2010; 7:9(5): 2191-9.
8. Bostanci N, Ramberg P, Wahlander A, Grossman J, Jönsson D, Barnes VM *et al.* Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in experimental gingivitis. *J Proteome Res.* 2013; 12(2): 657-678.
9. Burke W. Genomics as a probe for disease biology. *N Engl J Med.* 2003; 349: 969-974.
10. 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 Periodontal Res.* 2010; 45: 635-642.
11. Chung J, Choi MJ, Jeong SY, Oh JS, Kim HK. Chemokines gene expression of RAW 264.7 cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide using microarray and RT-PCR analysis. *Mol Cells.* 2009; 27: 257-261.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

12. Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Pelaez RP, Bazan NG, Lukiw WJ. Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *J Neurosci Res.* 2002; 70: 462-473.
13. Covani U, Marconcini S, Giacomelli L, Sivozhelevov V, Barone A, Nicolini C. Bioinformatic prediction of leader genes in human periodontitis. *J Periodontol.* 2008; 79: 1974-1983.
14. Craig J. (2008). Complex diseases: Research and applications. *Nature Education.* 2008; 1.
15. De Souza SL, Taba M Jr. Cross-sectional evaluation of clinical parameters to select high prevalence populations for periodontal disease: the site comparative severity methodology. *Braz Dent J.* 2004; 15: 46-53.
16. Demmer RT, Behle JH, Wolf DL, Handfield M, Kebschull M, Celenti R *et al.* Transcriptomes in healthy and diseased gingival tissues. *J Periodontol.* 2008; 79: 2112-2124.
17. Dennison DK, Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 54-78.
18. Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of periodontology. *Periodontol 2000.* 2013; 61(1): 16-53.
19. Divaris K, Monda KL, North KE, Olshan AF, Lange EM, Moss K *et al.* Genome-wide association study of periodontal pathogen colonization. *J DENT RES.* 2012; 91: S21-S28.
20. Fukushima A, Kusano M, Redestig H, Arita M, Saito K. Integrated omics approaches in plant systems biology. *Curr Opin Chem Biol.* 2009; 13: 532-538.
21. Garcia I, Tabak LA. Beyond the "omics": translating science into improved health. *J Am Dent Assoc.* 2008; 139: 392-395.
22. Giacomelli L, Covani U. Bioinformatics and data mining studies in oral genomics and proteomics: new trends and challenges. *Open Dent J.* 2010; 4: 67-71.
23. Gonçalves LDA R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia CH, Camisasca DR, Domont G *et al.* Analysis of the salivary proteome in gingivitis patients. *J Periodontal Res.* 2011; 46: 599-606.

24. Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 781-785.
25. Grant MM, Creese AJ, Barr G, Ling MR, Scott AE, Matthews JB *et al*. Proteomic analysis of a noninvasive human model of acute inflammation and its resolution: the twenty-one day gingivitis model. *J Proteome Res*. 2010; 9(9): 4732-4744.
26. Grant MM. What do 'omic' technologies have to offer periodontal clinical practice in the future? *J Periodontal Res*. 2012; 47: 2-14.
27. Gronert K, Kantarci A, Levy BD, Clish CB, Odparlik S, Hasturk H *et al*. A molecular defect in intracellular lipid signaling in human neutrophils in localized aggressive periodontal tissue damage. *J Immunol*. 2004; 172: 1856-1861.
28. Haigh BJ, Stewart KW, Whelan JR, Barnett MP, Smolenski GA, Wheeler TT. Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2010; 37: 241-247.
29. Haslett JN, Kunkel LM. Microarray analysis of normal and dystrophic skeletal muscle. *Int J Dev Neurosci*. 2002; 20: 359-365.
30. Hood L, Heath JR, Phelps ME, Lin B. Systems biology and new technologies enable predictive and preventive medicine. *Science*. 2004; 306: 640-643.
31. Kechschull M, Papananou PN. The use of gene arrays in deciphering the pathobiology of periodontal diseases. *Methods Mol Biol*. 2010; 666: 385-393.
32. Kim DM, Ramoni MF, Nevins M, Fiorellini JP. The gene expression profile in refractory periodontitis patients. *J Periodontol*. 2006; 77: 1043-1050.
33. Kinane DF, Mooney J, Ebersole JL. Humoral immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2006; 20: 289-340.
34. Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14: 430-449.
35. Kojima T, Andersen E, Sanchez JC, Wilkins MR, Hochstrasser DF, Pralong WF *et al*. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9), two calcium-binding proteins of the S100 family. *J Dent Res*. 2000; 79: 740-747.

36. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 72-77.

37. Kormman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol.* 2008; 79: 1560-1568.

38. Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontol 2000.* 2005; 39:53-72.

39. Lundy FT, Orr DF, Shaw C, Lamey PJ, Linden GJ. Detection of individual human neutrophil alpha-defensins (human neutrophil peptides 1, 2 and 3) in unfractionated gingival crevicular fluid--a MALDI-MS approach. *Mol Immunol.* 2005; 42: 575-579.

40. Meisel P, Siegemund A, Dombrowa S, Sawaf H, Fanghaenel J, Kocher T. Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1RN) in patients with periodontal disease. *J Periodontol.* 2002; 73: 27-32.

41. Nicholson JK, Wilson ID. Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat Rev Drug.* 2003; 2: 668-676.

42. Offenbacher S, Barros SP, Singer RE, Moss K, Williams RC, Beck JD. Periodontal disease at the biofilm-gingival interface. *J Periodontol.* 2007; 78: 1911-1925.

43. Papapanou PN, Neiderud AM, Sandros J, Dahlén G. Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. A case-control study. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 389-396.

44. Papapanou PN, Abron A, Verbitsky M, Pocolos D, Yang J, Qin J *et al.* Gene expression signatures in chronic and aggressive periodontitis: a pilot study. *Eur J Oral Sci.* 2004; 1123: 216-223.

45. Papapanou PN, Behle JH, Kebschull M, Celenti R, Wolf DL, Handfield M *et al.* Subgingival bacterial colonization profiles correlate with gingival tissue gene expression. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 221-232.

46. Razzouk S, Termatchi O. Host genome, epigenome and oral microbiome interactions: toward personalized periodontal therapy. *J periodontol.* 2012.

47. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med*. 2006; 354: 2463-2472.
48. Quirynen M, De Soete M, Dierickx K, Van Steenberghe D. The intraoral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J Clin Periodontol*. 2001; 28: 499-507.
49. Schäfer AS, Richter GM, Nothnagel M, Manke T, Dommisch H, Jacobs G *et al*. A genome-wide association study identifies GLT6D1 as a susceptibility locus for periodontitis. *Hum Mol Genet*. 2010; 19(3): 553-562.
50. Schäfer AS, Jepsen S, Loos BG. Periodontal genetics: a decade of genetic association studies mandates better study designs. *J Clin Periodontol*. 2011; 38:103-107.
51. Sørensen LK, Havemose-Poulsen A, Sønder SU, Bendtzen K, Holmstrup P. Blood cell gene expression profiling in subjects with aggressive periodontitis and chronic arthritis. *J Periodontol*. 2008; 79: 477-485.
52. Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis*. 2011; 17: 345-354.
53. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*. 2010; 1: 78-95.
54. Taba M Jr, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am*. 2005; 49: 551-571.
55. Takashiba S, Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*. 2006; 40: 94-106.
56. Tanke HJ. Genomics and proteomics: the potential role of oral diagnostics. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1098: 330-334.
57. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999; 4: 39-53.
58. Tyers M; Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003; 422: 193-197.
59. Uitto VJ. Gingival crevice fluid - an introduction. *Periodontol 2000*. 2003; 31: 9-11.
60. Wang PL, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M *et al*. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 4: 970-973.

61. Wu Y, Shu R, Luo LJ, Ge LH, Xie YF. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and health control subjects. *J Periodontal Res.* 2009; 44: 636-644.