

SORAYA CASTRO TRINDADE

Avaliação dos níveis séricos de anticorpos IgG e subclasses e IgA, reativos a *Porphyromonas gingivalis* em indivíduos com periodontites crônica e agressiva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia (UFBA), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Songelí Menezes Freire
Co-orientador: Prof. Dr. Isaac Suzart Gomes Filho

Salvador

2005

Biblioteca Prof. Penildon Silva – ICS- UFBA

T833 Trindade, Soraya Castro

Avaliação dos níveis séricos de anticorpos IgG e subclasses e IgA, reativos a *Porphyromonas gingivalis* em indivíduos com periodontites crônica e agressiva./ **Soraya Castro Trindade – Salvador, 2005.**
73f.: il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Songelí Menezes Freire
Co-orientador: Prof. Dr. Isaac Suzart Gomes Filho

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Imunologia, 2005.

1. Periodontite crônica. 2. Periodontite agressiva.
3. *Porphyromonas gingivalis*. 4. Resposta imune humoral. 5. anticorpos. 6. ELISA. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde. II. Título.

C.D.U.: 616.311.2-002

**Dedico este trabalho à minha mãe,
por sua eterna dedicação e esforço
para que eu pudesse seguir em frente.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Songelí Menezes Freire

Pelo grande aprendizado que foi a convivência ao seu lado
Pelo acolhimento no Labimuno
Pelos conhecimentos adquiridos

Ao Prof. Dr. Isaac Suzart Gomes Filho

Pelo exemplo e incentivo durante toda a minha vida acadêmica
Pela confiança e disponibilidade
Pela sua amizade

Ao meu marido, José Calheira e minha filha Luiza

Pelo carinho, amor e compreensão. Amo vocês.

Ao Prof. Dr. Roberto Meyer do Nascimento

Pelo acolhimento no Labimuno, pela confiança no meu trabalho, pela disponibilidade em discutir e transmitir os seus conhecimentos e por disponibilizar recursos para a execução do trabalho.
Pelo exemplo que se tornou na minha carreira acadêmica

À Profa. Dra. Ivana Lúcia Nascimento

Pela paciência, disponibilidade e incentivo

À Profa. Vera Vale

Pela sua paciência em transmitir seu conhecimento e experiência
Pela sua ajuda na execução do trabalho

À Profa. Lília Moura Costa

Pela sua ajuda no cultivo do *Porphyromonas gingivalis*
Pelo seu incentivo e carinho

Aos Profs. Robson Bahia e Renato Carminati

Pela colaboração na purificação do antígeno utilizado neste trabalho e pelo companheirismo

Ao Prof. Alexandre Pinheiro

Pela colaboração no preparo antígeno

Ao Prof. Dr. Alfredo Góes e Jamil Silvano de Oliveira

Pelo fracionamento do extrato sonicado de *Porphyromonas gingivalis* no ICB/UFMG

Ao Prof. Dr. Luiz Macêdo

Pela gentil cessão do *Porphyromonas gingivalis* no ICB/UFMG

Aos colegas do Labimuno: Livia Pugliese, Paulo Juiz, Renata Roseghini, Márcia Brandão, Milene Salomão, Paula Moreira, Vera Vale, Renato Carminati, Robson Bahia, Marcos Ribeiro e Mônica Franca.

Pelo companheirismo e incentivo, e por tornarem mais divertidos os momentos árduos durante esta jornada

Aos colegas da disciplina Diagnóstico Oral I: Isaac Suzart Gomes Filho, Teresinha Costa de Santana, Antonio Cesar Oliveira de Azevedo, Dario Augusto Oliveira Miranda, Adriano Monteiro d'Almeida Monteiro e Viviane de Almeida Sarmento
Pelo incentivo constante, companheirismo e amizade

Às Funcionárias da Clínica Odontológica da Cooperfeira: Nice, Geane, Anete e em especial à Zorilda
Pela grande boa vontade em colaborar no atendimento aos voluntários da pesquisa

Aos voluntários participantes da pesquisa
Pela sua imensa colaboração

Aos estagiários do Labimuno: Miguel, Marcos, Ana Paula, Andréa, Danielle, Érica, Isamar, Gerson
Pela ajuda na execução das técnicas laboratoriais

Aos monitores e estudantes de iniciação científica da disciplina Diagnóstico Oral I: Tiago, Bruno, Matheus, Maurício, Kaliane, Helder, Mariana, Jorge, Marcus, Ivana e Aline
Pela ajuda no atendimento aos pacientes e coleta de dados

Funcionários do Labimuno
Pelo apoio no desenvolvimento do trabalho

Agradeço especialmente à Universidade Estadual de Feira de Santana
Por proporcionar a minha constante capacitação profissional e por disponibilizar recursos para a execução do trabalho

CONSIDERAÇÕES

A realização deste projeto foi possível pela colaboração estabelecida entre os grupos da Universidade Estadual de Feira de Santana – Núcleo de Pesquisa em Periodontia, Implantodontia e Imaginologia da Universidade Federal da Bahia – Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular. Durante este período, foram apresentados em eventos científicos e/ou publicados os seguintes trabalhos:

- Trindade SC, Gomes-Filho IS, Meyer R, Passos JS, Botto B, Moyakhar B, Freire S. Compreendendo o papel biológico da interleucina-1 e sua relação com a doença periodontal. **Revista Internacional de Periodontia Clínica**, 2004; 1(3):121-126.
- Trindade SC, Freire S, Silveira BBB, Brandão TL, Moraes LC, Gomes-Filho IS. Compreendendo o papel da interleucina-1 e sua relação com a doença periodontal. **Jornada UNIME de Odontologia**, 2003.
- Trindade SC. Avaliação dos níveis de anticorpos IgG e suas subclasses com especificidade para *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em indivíduos portadores de doença periodontal crônica. **I Seminário de Periodontia em Saúde Coletiva**, 2004.

Artigos a serem submetidos a publicação/apresentação:

- Trindade S; Gomes-Filho I; Meyer R; Shaer, R; Nascimento I; Moura-Costa L; Vale, V; Pugliese, L.; Botto, B.; Freire, S. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* in chronic and aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**.
- Trindade S; Gomes-Filho I; Meyer R; Shaer, R; Nascimento I; Moura-Costa L; Vale, V; Pugliese, L.; Botto, B.; Freire, S. Association between humoral response and severity of periodontal disease. **Journal of Periodontology** (em preparação).

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE FIGURAS
RESUMO
ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. A Evolução dos conceitos relacionados à doença periodontal.....	16
2.2. <i>Porphyromonas gingivalis</i> na patogênese da doença periodontal	18
2.3 A Resposta imune humoral a <i>Porphyromonas gingivalis</i>	20
2.3.1. O papel da imunoglobulina G e suas subclasses na patogênese da doença periodontal.....	21
2.3.2. O papel da imunoglobulina A na patogênese da doença periodontal	26
3. OBJETIVOS	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1. Delineamento do estudo.....	29
4.2. Coleta de Sangue/Obtenção de soro	31
4.3. Preparação dos antígenos	31
4.4. Avaliação da antigenicidade do extrato sonicado bruto e das frações cromatográficas de <i>P. gingivalis</i> ATCC33277	33
4.3. Análise estatística	38
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXO.....	63
APÊNDICES.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
AAP	Academia Americana de Periodontia
ATCC	“American Type Culture Collection” – Banco de Coleção de Culturas Americanas
BSA	Albumina Sérica Bovina
CD	“Cluster of Differentiation” – Diferenciação de Grupo
CBB	“Coomassie Brilliant Blue” – Azul Brilhante de Coomassie
DO	Densidade Óptica
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” – Ensaio Imunoenzimático
FC γ R	Receptor para a fração Fc da imunoglobulina G
FPLC	“Fast Performance Liquid Chromatography” – Cromatografia em Fase Líquida de Performance Rápida
FtC	Fator de Correção
G	Gengivite
IFN- γ	Interferon- γ
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG2	Imunoglobulina G subclasse 2
IgG3	Imunoglobulina G subclasse 3
IgG4	Imunoglobulina G subclasse 4
IgM	Imunoglobulina M
kDa	Quilodalton
ICB/UFMG	Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
LB	Linfócito B
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Linfócito T
NIC	Nível de inserção clínica
nm	Nanômetro
OPD	Ortofenilenodiamina
PA	Periodontite Agressiva
PC	Periodontite Crônica
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PJL	Periodontite Juvenil Localizada
PM	Peso Molecular
PMN	Polimorfonuclear

PPR	Periodontite de Progressão Rápida
PSA	Persulfato de Amônio
RF	Valor de Referência
ROC	“Receiver Operating Characteristic” – Curva Operacional Relativa
PCS	Periodonto Clinicamente Sadio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS
SN	“Silver Nitrate” – Nitrato de Prata
SPSS	“Statistical Package for Social Sciences” – Programa Estatístico para Ciências Sociais
STF	Salina Tamponada com Fosfato
TEMED	N´N´N´N´- tetrametilenodiamina
TGF- β	Fator Transformador de Crescimento - β
TH1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
TH2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TLR	“Toll-like Receptor” – Receptor do tipo Toll
TNF α	Fator de Necrose Tumoral - α

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Características e efeitos biológicos das imunoglobulinas IgA, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. 22
- Quadro 2:** Critérios para o diagnóstico clínico da doença periodontal. 38
- Quadro 3:** Diluições utilizadas nos testes de ELISA para detecção de níveis séricos de subclasses de IgG reativas ao extrato sonicado e à fração IV de *P. gingivalis* ATCC33277.38
- Quadro 4:** Níveis de significância (α) entre os grupos com periodonto saudável (SP), gengivite/periodontite leve (GP), periodontite crônica (PC) e periodontite agressiva (PA), referentes ao extrato sonicado bruto de *P. gingivalis* ATCC 33277, obtidos pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney. 40
- Quadro 5:** Níveis de significância (α) entre os grupos com periodonto saudável (SP), gengivite/periodontite leve (GP), periodontite crônica (PC) e periodontite agressiva (PA), referentes à fração IV do extrato sonicado de *P. gingivalis* ATCC 33277, obtidos pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney. 45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** A) Perfil eletroforético do extrato sonicado bruto de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 (coloração com azul de coomassie). B) Perfil eletroforético da fração IV, obtida após cromatografia do extrato sonicado de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 em coluna Mono-Q (coloração com nitrato de prata). 41
- Figura 2:** Perfil de reconhecimento sorológico por Western blotting da fração IV do extrato sonicado de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277. B: Branco; SP: “pool de soros de indivíduos saudáveis; PC: “pool de soros de indivíduos com periodontite crônica; PA: “pool” de soros de indivíduos com periodontite agressiva. 41
- Figura 3:** Níveis de IgA reativa ao extrato sonicado bruto (A) e à fração IV (B) de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 avaliados por ELISA indireto . 42
- Figura 4:** Níveis de IgG reativa ao extrato sonicado bruto (A) e à fração IV (B) de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 avaliados por ELISA indireto . 42
- Figura 5:** Reatividade sorológica ao extrato sonicado bruto de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 avaliada por ELISA indireto: níveis de IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) e IgG4 (D). 42
- Figura 6:** Reatividade sorológica à fração IV do extrato sonicado de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 avaliada por ELISA indireto: níveis de IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) e IgG4 (D). 43

RESUMO

A periodontite é uma doença inflamatória bucal causada por agentes multifatoriais intrínsecos e extrínsecos, incluindo bactérias Gram-negativas, como *Porphyromonas gingivalis*. Este estudo foi realizado para avaliar os níveis séricos de IgA, IgG e subclasses de IgG reativos a *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277. Foram examinados 89 pacientes, divididos em quatro grupos: 29 com periodontite crônica (PC), 12 com periodontite agressiva (PA), 22 com gengivite ou periodontite leve (GP), e 26 com periodonto clinicamente sadio (PS). A resposta imune humoral foi avaliada por testes de ELISA, para verificar os níveis séricos de IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgA reativos ao extrato sonicado bruto de *P. gingivalis* ATCC 33277 e à fração IV obtida por cromatografia. Os níveis de IgA, IgG ($p<0,01$), IgG2, IgG3 and IgG4 à fração IV foram maiores no grupo PC que no grupo SP. O grupo PC apresentou níveis mais altos de IgG and IgG4 reativas a ambos os antígenos que o grupo GP e níveis mais altos de IgG and IgG4 reativas ao extrato sonicado bruto que o grupo PA. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos níveis de IgG reativa às duas preparações de *Pg* ($p<0,01$), IgG2 reativa à fração IV ($p<0,01$), IgG3 reativa à fração IV ($p<0,05$) e IgG4 reativa ao extrato bruto e à fração IV ($p<0,05$) entre os grupos PA e SP. Os níveis de IgG1 ao extrato sonicado bruto foram maiores no grupo GP que no grupo AP ($p<0,05$). Os resultados sugerem que o ELISA indireto para a detecção de IgG total e IgG4 reativas aos dois antígenos e IgG3 reativa à fração IV permitiram as melhores condições de discriminação entre os grupos, com a IgG4 reativa à fração IV apresentando o melhor desempenho. A produção de anticorpos na periodontite agressiva não apresentou um padrão definido em relação aos isotipos estudados.

Palavras-chave: Periodontite crônica, periodontite agressiva, *Porphyromonas gingivalis*, Resposta imune humoral, anticorpos, ELISA.

ABSTRACT

Periodontitis is an inflammatory oral disease caused by multifactorial intrinsic and extrinsic agents including Gram-negative bacteria, like *Porphyromonas gingivalis*. This study was undertaken to evaluate immunoglobulin A, Immunoglobulin G and immunoglobulin G isotype serum antibodies against *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277. This study included 89 patients divided in four groups: 29 chronic periodontitis (CP), 12 aggressive periodontitis (AP), 22 gingivitis or mild periodontitis (GP), and 26 healthy controls (HC). Humoral response was assayed by ELISA to verify serum levels of IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 and IgA reacting to sonicated *P. gingivalis* ATCC 33277 crude extract and fraction IV obtained by chromatography. Serum levels of IgA, IgG ($p<0,01$), IgG2, IgG3 and IgG4 to the fourth eluate was higher in CP group compared to healthy control. CP group had higher levels of IgG and IgG4 to both antigens than GP group and higher levels of IgG and IgG4 to sonicate than AP group. There were statistically significant differences in serum levels of IgG to both antigens ($p<0,01$), IgG2 to fraction IV ($p<0,01$), IgG3 to fraction IV ($p<0,05$) and IgG4 to both antigens ($p<0,05$) between AP and HC groups. IgG1 titers to sonicate were significantly elevated ($p<0,05$) in GP compared to AP group. The findings suggest that the ELISA method to detect IgG and IgG4 to both antigens and IgG3 to fraction IV allow one to discriminate the groups, but IgG4 to fraction I was the best for discriminating among groups. Antibody production in the aggressive periodontitis group was not regular with respect to the isotypes analyzed.

Key Words: Chronic periodontitis, aggressive periodontitis, *Porphyromonas gingivalis*, Humoral immune response, antibodies, ELISA.

1. INTRODUÇÃO

A periodontite é geralmente considerada como uma patologia conseqüente à interação desfavorável hospedeiro-parasita, na qual bactérias periodontopatogênicas presentes no biofilme subgingival são as determinantes da doença. Os aspectos histopatológicos da periodontite caracterizam-se por presença de leucócitos polimorfonucleares no epitélio juncional e no epitélio da bolsa; denso infiltrado celular inflamatório com presença de plasmócitos, linfócitos e macrófagos; migração apical do epitélio juncional; destruição de fibras colágenas; reabsorção óssea; (PAGE et al., 1975; PAGE e SCHROEDER, 1976). Clinicamente, pode-se observar vermelhidão, edema, sangramento, retração gengival, presença de secreção purulenta, perda de inserção clínica, presença de bolsas periodontais, podendo ocorrer ainda recessão gengival, mobilidade, migração e exfoliação dentária (SOCRANSKY et al., 1984; LÖE et al., 1986; JEFFCOAT e REDDY, 1991).

Os principais periodontopatógenos colonizadores do biofilme são *Porphyromonas gingivalis* (HOSOGI, HAYAKAWA e ABIKO, 2001), *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forshytia* (anteriormente denominado *Bacteroides forshytus*), *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Treponema denticola* (ASHIMOTO et al., 1996) Entretanto, a distribuição e colonização de bactérias periodontopatogênicas não está correlacionada com a distribuição da periodontite, indicando que a associação entre bactéria e periodontite é fraca (CLARKE e HIRSCH, 1995). O início e progressão da doença são causados por uma infecção mista, na qual alguns microrganismos podem não ser patógenos evidentes, desempenhando um papel no processo mórbido, por favorecerem condições que promovem o potencial de virulência dos patógenos (DARVEAU, 1997).

Pesquisas posteriores sugeriram que a periodontite ou doença periodontal representa várias entidades clínicas distintas que se manifestam por uma diversidade de aspectos clínicos, microbiológicos, histopatológicos, bioquímicos e imunológicos (PAGE e SCHROEDER, 1982; JORGE, 1995). Sua variabilidade deve ser atribuída apenas parcialmente à etiologia bacteriana, sendo atualmente considerada de natureza multifatorial, onde mecanismos celulares e moleculares estão envolvidos na sua regulação, baseados no tripé resposta imune-desafio bacteriano-suscetibilidade genética.

Os eventos inflamatórios e imunológicos que ocorrem no tecido periodontal em resposta à infecção microbiana impedem que os microrganismos se disseminem para os tecidos, mas esta resposta do hospedeiro é também passível de causar a destruição das estruturas vizinhas, podendo inclusive envolver os tecidos de sustentação no processo destrutivo. Ainda não está esclarecido porque algumas lesões permanecem localizadas na margem gengival, enquanto outras progridem para os tecidos de suporte, nem porque esta progressão ocorre de forma mais lenta em alguns indivíduos e mais rápida em outros. Sabe-se que esta ocorre de forma episódica, com alguns sítios apresentando surtos de destruição, seguidos de períodos de quiescência. A probabilidade de que esta perda de inserção ocorra em um determinado período de tempo é que vem caracterizar o sítio de risco (GOMES-FILHO, 1993).

Entretanto, os meios de diagnóstico e prognóstico disponíveis na prática clínica periodontal, como o exame de profundidade de sondagem de sulco ou bolsa, índice de sangramento à sondagem, índice de recessão ou hiperplasia gengival, nível de inserção, índice de mobilidade e exame radiográfico, não conseguem prever o momento exato da ativação da doença, informando apenas que a destruição tecidual já ocorreu. Os testes baseados na composição da microbiota subgengival e na resposta do hospedeiro

poderiam identificar o risco de atividade de doença, predizer futuros surtos destrutivos, ou até mesmo identificar indivíduos suscetíveis (LOTUFO, 1999).

A maioria dos estudos sobre a resposta imune humoral a microrganismos na periodontite enfocam *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, devido a sua associação com a doença. Conhecendo-se a importância da diferença dos papéis e funções biológicas das diversas classes e subclasses de imunoglobulinas, o presente estudo buscou avaliar a resposta imune humoral pelos níveis de anticorpos séricos IgG e subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgA reativos a *Pg* em indivíduos com periodontite crônica, periodontite agressiva, gengivite/periodontite leve e periodonto clinicamente sadio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Evolução dos Conceitos Relacionados à Doença Periodontal

A doença periodontal atinge a raça humana desde seus primórdios, tendo sido observada já em fósseis do homem de Neanderthal, como também em espécimes da civilização egípcia. Já foi relatado que escritos médicos chineses de Hwang-Fi, 2.500 a.C., classificavam as doenças orais em três tipos: Fong Ya seriam os estados inflamatórios, Ya Kon caracterizavam-se por doenças relacionadas aos tecidos moles periodontais e Chong Ya correspondiam às cáries dentárias. No primeiro século d.C., Celsus relatou uma espécie de doença que separava a gengiva dos dentes e tinha odor desagradável. Albucasis (963-1013) descreveu com surpreendente precisão para a época, a relação entre cálculo e as doenças periodontais, e chegou mesmo a desenvolver um jogo de instrumentos para a remoção do material calcificado (SCHLUGER, S. *et al.*, 1977).

Alguns autores nos séculos XVIII e XIX descreveram a doença periodontal e aprimoraram a sua classificação. Tornou-se clássica a descrição de evolução da doença periodontal por J. M. Riggs, cujo nome se tornou, por algum tempo, sinônimo de doença periodontal. A classificação de RIGGS levava em conta que os diferentes estágios da doença compreendiam etapas de uma mesma entidade clínica (RIGGS apud GOLD, 1985). O conhecimento da doença periodontal e sua etiologia têm sofrido avanços com o tempo. No início do século XX, as amebas foram relacionadas como causa da doença avançada, surgindo então a utilização de hidrocloreto para a resolução de doenças. A partir da década de 1930, entretanto, o conceito evoluiu, sendo a doença periodontal descrita como de etiologia bacteriana, mas não de maneira exclusiva. Considerou-se até a década de 1960, que a placa bacteriana e o cálculo tinham papel importante no

estabelecimento da doença, mas outros fatores podiam levar à inflamação gengival, como o apinhamento de dentes, excesso de restaurações, irritação mecânica provocada por próteses mal-adaptadas, entre outros (GOLD, 1985).

À medida que os estudos relacionados à doença periodontal foram evoluindo, surgiu a necessidade de classificação desta entidade em vários subtipos, que se caracterizam por entidades clínicas distintas e se manifestam por uma diversidade de aspectos clínicos, microbiológicos, patológicos, bioquímicos e imunológicos (JORGE, 1995), sendo consideradas então de etiologia multifatorial. Atualmente, as variações individuais na capacidade de resposta do hospedeiro frente ao desafio bacteriano vêm sendo relacionadas às diferenças na progressão da destruição tecidual. Algumas condições sistêmicas como doenças endócrinas, fumo, estresse, deficiências nutricionais, anemia, tumores, entre outras, têm sido apontadas como importantes na determinação da progressão do colapso tecidual. Além disso, a produção sistêmica e local de componentes imunológicos e inflamatórios, bem como a regulação genética destes mediadores (EHMKE et al, 1999; THOMSON et al., 2001; MICHALOWICZ et al., 1991; MARAZITA et al, 1994), são fatores contribuintes para as diferenças no padrão de destruição periodontal das diversas entidades clínicas.

A análise das doenças periodontais como o resultado da interação do hospedeiro com a microbiota levou à necessidade de classificação mais abrangente da periodontite. A Academia Americana de Periodontia (AAP), em 1999, classificou as periodontites em periodontite crônica, periodontite agressiva, periodontite ulcerativa necrosante e abscesso periodontal, considerando que a interação hospedeiro-microbiota pode ser modulada por fatores intrínsecos e extrínsecos e que a extensão e severidade da doença dependem da resposta do hospedeiro.

Nesta classificação das Doenças e Condições Periodontais, o termo “Periodontite do adulto” foi substituído por “Periodontite crônica”, por sua ocorrência não estar limitada a indivíduos com idade superior a 35 anos, como preconizado anteriormente. Nesta forma de doença, a destruição é geralmente lenta ou moderada e compatível com a presença de acúmulos bacterianos locais; observa-se a presença de cálculo subgengival, ocorrência de bolsas periodontais e recessão gengival (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999). De acordo com Socransky *et al.* (1999), os principais patógenos envolvidos com a periodontite crônica são *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forshytia* e *Treponema denticola*.

Ainda de acordo com a AAP, a periodontite agressiva, anteriormente denominada “Periodontite de início precoce”, manifesta-se pela rápida destruição dos tecidos periodontais, incompatível com a presença de fatores locais; existem evidências de microrganismos específicos, como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* no desenvolvimento da doença (TONETTI e MOMBELLI, 1999).

2.2 *Porphyromonas gingivalis* na Patogênese da Doença Periodontal

Na cavidade bucal humana, existe uma variedade de bactérias gram-negativas com fatores de virulência que participam no desenvolvimento das doenças periodontais. Ashimoto *et al.* (1996) identificaram por reação em cadeia da polimerase (PCR) uma alta prevalência de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forshytia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Treponema denticola* em amostras de indivíduos adultos com periodontite avançada, em relação a indivíduos adultos e crianças com gengivite.

Especificamente *Porphyromonas gingivalis*, uma bactéria Gram-negativa, produtora de pigmento negro, encontrada nas bolsas periodontais de pacientes com periodontite, tem sido implicada como um dos patógenos periodontais mais importantes no desenvolvimento da periodontite. Esta associação ocorre devido a sua presença correlacionada aos achados clínicos, e por sua capacidade de produzir várias proteases, além de induzir a doença em primatas e invadir células epiteliais do hospedeiro. Inúmeros fatores de virulência produzidos por esta espécie podem estar envolvidos na interação bacteriana com o hospedeiro, desde a colonização e destruição tecidual até a sua evasão do sistema imune. Além disso, essa bactéria possui atividades hemaglutinantes e hemolíticas. A lise de eritrócitos por este patógeno oral possibilita o fornecimento de moléculas hemo-derivadas para o seu crescimento na bolsa periodontal. Em geral, a inserção bacteriana aos eritrócitos é um passo inicial importante para a expressão da atividade hemolítica (HOSOGI, HAYAKAWA e ABIKO, 2001). Em um modelo experimental de periodontite em ratos Fischer F(344), com 8 a 10 semanas de vida, a imunização com o ligante do domínio para hemaglutinina HA2 de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 promoveu proteção contra a doença. A proteção estava associada a anticorpos IgG produzidos contra HA2 (De CARLO *et al.* 2003).

O lipopolissacarídeo (LPS) liberado por *Porphyromonas gingivalis*, além de diferentes atividades, induz atividade de reabsorção óssea *in vivo*. Wang *et al.* (2002), em um modelo experimental de periodontite em camundongos C3H/HeN, conseguiram inibir significativamente a produção de interleucina-6 e a reabsorção óssea nos tecidos gengivais, induzida pelo LPS de *Porphyromonas gingivalis*.

As proteinases específicas para arginina e lisina (arg-gingipaína: Rgp, lys-gingipaína: Kgp) são os principais fatores de virulência do *Porphyromonas gingivalis*. Estudos recentes sugerem que os anticorpos específicos para as gingipaínas podem

exercer um papel protetor contra a infecção por *Porphyromonas gingivalis* (INAGAKI *et al.*, 2003; KUBONIWA *et al.*, 2001; SLANEY *et al.*, 2002). Proteínas de choque térmico também parecem exercer algum papel nos mecanismos imunes da periodontite. Anticorpos séricos específicos para hsp60 humana e de *P. gingivalis* parecem ter reatividade cruzada (TABETA *et al.*, 2000), sugerindo uma similaridade molecular entre as duas proteínas e o seu possível envolvimento na imunopatogênese da periodontite e até nos mecanismos de doenças auto-imunes em humanos (CHUNG *et al.*, 2003).

2.3 A Resposta Imune Humoral a *Porphyromonas gingivalis*

No homem, a IgA, IgG e suas subclasses estão presentes em diferentes proporções no soro e participam de eventos biológicos diversos, descritos no quadro 1 (ABBAS *et al.* 2004; JANEWAY *et al.*, 1999; HENRY, 1999). Entretanto, o papel e a associação destas imunoglobulinas no desenvolvimento das doenças periodontais são pouco compreendidos.

A maioria dos estudos sobre a resposta imune humoral a microrganismos na periodontite enfocam *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, devido a sua associação com a doença. Os níveis séricos de anticorpos IgG e IgA reativos a *P. gingivalis* e *A. Actinomycetemcomitans* e IgA reativa a *P. intermedia* encontram-se significativamente mais altos em indivíduos com periodontite agressiva generalizada que em indivíduos com periodontite crônica, sugerindo que estes anticorpos podem exercer um papel significativo na patogênese da doença (ALBANDAR *et al.*, 2001).

Segundo Onoue *et al.* (2003), os anticorpos específicos para o lipopolissacarídeo (LPS) da *P. gingivalis* e *F. nucleatum* estão aumentados no soro de pacientes com periodontite do adulto (atualmente classificada como periodontite crônica), embora nenhuma correlação estatisticamente significativa tenha sido observada entre a severidade da periodontite e os títulos de anticorpos.

As diferentes imunoglobulinas apresentam diversas atividades biológicas que facilitam e incrementam a atividade de fagócitos e células “natural killer” (NK), como a IgG, enquanto IgA representam o seu papel mediador com a neutralização do agente invasor. Saito *et al.*, em 1996 relataram a ativação das vias clássica e alternativa do complemento, em um modelo *in vitro*, com proteína recombinante de *P. gingivalis*.

2.3.1 O Papel da Imunoglobulina G e suas Subclasses na Patogênese da Doença Periodontal

As imunoglobulinas exercem papéis importantes na patogênese, diagnóstico, terapia e prevenção de doenças. O perfil de resposta a *P. gingivalis* tem sido registrado demonstrando uma associação positiva entre a magnitude da resposta humoral do hospedeiro e a condição da doença periodontal. Sakai *et al.*, em 2001, sugeriram que uma resposta prolongada de IgG2 após o tratamento periodontal pode ser indicativa de destruição periodontal recorrente ou persistente. Fredriksson *et al.*, (1999) relataram que uma concentração mais baixa de IgG2 em pacientes fumantes pode prejudicar a função do neutrófilo e ser um mecanismo pelo qual o fumo agrava a periodontite.

Califano *et al.* (1999) observaram respostas potentes de IgG2 contra antígenos carboidratos do sorotipo K de *P. gingivalis* em indivíduos com periodontite crônica e periodontite agressiva. Já Pietrzak *et al.* (1998) sugeriram que a presença de IgG3 pode refletir na não suscetibilidade à doença, enquanto a diminuição de IgG4 pode ser indicativa de saúde periodontal e queda da infecção.

Ogawa *et al.*(1990) relataram que a IgG2 é a subclasse dominante na resposta contra o LPS de *P. gingivalis* e que a distribuição das subclasses contra uma proteína purificada da fímbria desta bactéria foi IgG3>IgG1>IgG2>IgG4. Entretanto, em um estudo anterior realizado pelo mesmo grupo, a distribuição das subclasses específicas para

fímbria foi predominantemente de IgG4, acompanhada por IgG1>IgG3>IgG2 (Ogawa *et al.*, 1989a,b).

Quadro 1: Características e efeitos biológicos das imunoglobulinas IgA, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

	IgA	IgG Total	IgG1 %66 ± 8	IgG2 %23 ± 8	IgG3 %7,3 ± 3,8	IgG4 %4,2 ± 2,6
Neutralização	+3	+	+3	+3	+3	+3
Opsonização	+1	+	+3	-	+3	+1
Passagem pela Placenta	-	+	+	±	+	+
Ativação do complemento via clássica	-	+	+2	±	+3	-
Fixação de mastócitos e basófilos homólogos	-	±				
Atividade de ligação ao fator reumatóide	-	+				
Ligação citofílica a macrófagos	±	+	+	-	+	-
Presença nas secreções externas	+4	+				
Capacidade aglutinante	+2	±				
Sensibilização para morte por NK	-	+	+3	-	+3	-
Peso Molecular (kDa)	160		146	146	165	146
Meia-vida (dia)	5-6,5	18-23	23	23	7	23
Faixa de concentração sérica (mg/mL)	2,1	13	9	3	1	0,5

Adaptado de Henry *et al.*, 1999.

Porphyromonas gingivalis é um patógeno suspeito também em algumas periodontites agressivas. As respostas *in vivo* e *in vitro* aos patógenos associados com a periodontite agressiva - *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* - parecem ser dominadas por IgG2 e estas respostas de IgG2 estão associadas com a extensão e severidade reduzidas da doença. Sabe-se pouco sobre a regulação da subclasse IgG2, embora tanto a prostaglandina E₂ (PGE₂) (um mediador conhecido por polarizar as respostas para Th2) quanto o interferon- γ (IFN- γ) (um mediador Th1) promovam a produção de IgG2 (TANAKA *et al.*, 2003).

De acordo com Whitney *et al.* (2002), a predominância relativa de IgG2, uma subclasse que não promove opsonização e tem pouca atividade de fixação de

complemento, e a baixa avidéz de anticorpos IgG anti-*Pg* sugerem que a resposta humoral contra a infecção com *P. gingivalis* pode ser ineficaz nos indivíduos com periodontite de progressão rápida.

Albandar *et al* (2002) não encontraram associação da resposta sérica de IgG e subclasses, IgA e IgM em negros com periodontite de início precoce (atualmente classificada como agressiva). É possível que a raça, a despeito da classificação da doença periodontal, tenha efeito na concentração sérica de anticorpos: os negros apresentaram maior concentração de IgG1, IgG2 e IgG3 que os hispânicos, enquanto estes últimos apresentaram maior concentração de IgM e IgG4. As concentrações séricas médias de IgG e IgA determinada em 3.213 indivíduos caucasóides na faixa etária de 20 a 75 anos variaram entre 10,69-12,36 mg/mL e entre 1,32-2,66 mg/mL, respectivamente (CASSIDY *et al.*, 1974 apud HENRY, 1999).

De acordo com Choi *et al.* (1996), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* têm sido implicados como o patógeno primário periodontal na periodontite juvenil localizada (PJL) e a periodontite de progressão rápida (PPR), respectivamente. Acredita-se que a resposta da IgG2 para *A. actinomycetemcomitans* ou *P. gingivalis* pode ser um fator determinante para o desenvolvimento da doença localizada ou generalizada. Os autores sugeriram que o desequilíbrio do *locus* de cadeia pesada Gm(n) nos pacientes com PPR ou do *locus* de cadeia leve Km(1) nos pacientes com PJL pode estar associado com respostas altas de IgG2 reativa às respectivas bactérias.

Guo *et al.* (2000), avaliaram as respostas dos anticorpos contra as infecções por *P. gingivalis* em pacientes com periodontite de início precoce para posterior elucidação da interação parasita-hospedeiro na patogênese da doença. Os resultados indicaram que a resposta dos anticorpos dos pacientes com periodontite de início precoce contra

infecções com *P. gingivalis* não difere significativamente dos pacientes com periodontite crônica.

Segundo Baker *et al.*, (1999), a periodontite crônica é muito prevalente entre os humanos e está associada com a presença da bactéria *P. gingivalis* e os anticorpos relacionados não aparecem até que a perda óssea tenha ocorrido; esta possibilidade dificulta os testes de diagnóstico, sendo a resposta humoral específica predominantemente de isotipos de IgG, embora baixos níveis de soro de IgA específico estejam também presentes. Entretanto, a presença do anticorpo específico não previne o começo ou a progressão da perda óssea.

Kawashima e Ishikawa, em 2002, detectaram IgG específica para bactérias periodontopatogênicas por “dot blotting” e sugeriram que este é um método simples e rápido para a detecção de anticorpos séricos, como promessa para avaliação laboratorial. Já Pussinen *et al.* (2002) mediram anticorpos IgG específicos para *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, em indivíduos finlandeses com periodontite crônica, por um ELISA com misturas de antígenos de muitos sorotipos de patógenos. Para o *A. actinomycetemcomitans*, o antígeno foi constituído de seis cepas representando os sorotipos a, b, c e d (ATCC 29523, ATCC 43718, ATCC 33384, IDH 781, IDH 1705 e C59A, respectivamente) e uma cepa sem sorotipo característico. No ELISA para *Pg*, os antígenos representavam os sorotipos a, b e c (ATCC 33277, W50 e OMGS 434). De acordo com os autores, a mistura de sorotipos no ELISA mostrou-se satisfatória para medir anticorpos específicos para patógenos periodontais em grandes estudos epidemiológicos, a fim de avaliar o papel da periodontite como fator de risco para outras doenças.

Os efeitos sistêmicos da periodontite e do fumo nos parâmetros sanguíneos foram comparados separadamente e em combinação por Fredriksson *et al.*, (1999), a fim de

estudar a hiperreatividade em neutrófilos periféricos. Eles sugeriram que a concentração mais baixa de IgG2 em pacientes fumantes pode prejudicar a função do neutrófilo e ser um mecanismo pelo qual o fumo agrava a periodontite. Em geral, a combinação de periodontite e fumo altera os parâmetros estudados. Os efeitos da periodontite na proteína C reativa e IgG2 significam que a lesão periodontal pode também liberar agentes estimulantes dos neutrófilos. Graswinckel *et al.*, em 2004, investigando níveis plasmáticos de IgG total e subclasses, IgA e IgM, em indivíduos com periodontite, com relação à severidade da doença, fumo, diagnóstico e prevalência de periodontopatógenos, verificaram que os níveis de IgG, IgA e IgM não diferiram entre os indivíduos sadios e doentes. Entretanto, em indivíduos com periodontite, foram observados níveis mais altos de IgG2. O fumo pareceu estar inversamente relacionado aos níveis de anticorpos na periodontite, em particular à IgG total e à IgG2.

Barr-Agholme *et al.*, em 1998, determinaram as condições periodontais e os níveis salivares de IgA, IgM e a distribuição de todas as subclasses de IgG e albumina, quantificados por ELISA, em indivíduos com síndrome de Down e sadios. A inflamação gengival e a ocorrência de bolsas periodontais maiores que 4mm eram mais extensas ($p < 0,05$) entre os indivíduos com síndrome de Down, mas os níveis de IgA, IgM e a soma das subclasses de IgG, e a concentração de albumina não diferiu significativamente entre os dois grupos. Entretanto, a proporção de IgG1 expressa em porcentagem da soma total de IgG foi significativamente maior ($p < 0,01$) no grupo com síndrome de Down comparado com o grupo controle, indicando uma distribuição alterada de subclasses de IgG na saliva.

2.3.2 O Papel da Imunoglobulina A na Patogênese da Doença

Periodontal

Estudos recentes sugerem que a imunoglobulina A (IgA) produzida localmente poderia ser mais protetora que a IgG e que poderia existir uma relação entre os níveis de IgA específica no fluido gengival e na saliva e o início da doença periodontal (PLOMBAS *et al.*, 2002). Avaliando o efeito da terapia periodontal na resposta imune a *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, Mooney *et al.*, (1995) investigaram a concentração sérica de anticorpos específicos, expressos em títulos, e anticorpos com forte ligação, expressos em avidéz relativa. Os achados sugerem que a terapia periodontal afeta a magnitude e qualidade da resposta imune humoral a periodontopatógenos suspeitos. Este efeito é dependente do estado do soro antes do tratamento e este estado inicial pode ter uma influência no resultado do tratamento.

Wittstock *et al.*, em 1996 examinaram as respostas séricas de IgA, IgM e IgG específicas para uma colagenase recombinante, em indivíduos com periodontite crônica e periodontite agressiva, através de “imunoblot” e os resultados do estudo indicaram uma concordância próxima do total ($k=0,856$) entre a presença de IgA colagenase-específica e a detecção de *Pg* por PCR. Com o uso do PCR como “padrão ouro”, a sensibilidade e especificidade do teste de imunoblot IgA foram 94,7% e 90,9%, respectivamente. Os autores propuseram a colagenase recombinante como candidata potencial para o uso no sorodiagnóstico de periodontite.

Foi relatado que *Macaca fascicularis* imunizados com bactérias *Pg* 5083 mortas por formalina foram protegidos contra a perda óssea da periodontite. Para examinar os mecanismos de proteção, Houston *et al.* (1999) determinaram os títulos de IgG, IgM e IgA específicos e a capacidade de opsonização do soro de animais imunizados e controle. Os títulos de IgG e IgA séricos para *Pg* apareceram precocemente e persistiram pelo período

de observação de 36 semanas. Os títulos de IgM estiveram elevados até 6 a 12 semanas e então foram decrescendo, até a semana 36. Nos macacos controle, não foram observados títulos significativos de IgG, IgA ou IgM. No soro de animais imunizados foi observada uma capacidade de opsonização estatisticamente significativa entre a 6^a e 12^a semana, que persistiu através do estudo. Em contraste, os soros controle mostraram pouca capacidade de opsonização. Os títulos de anticorpos anti-Pg nas frações purificadas de IgG, IgA e IgM foram determinados por ELISA, e a atividade de opsonização foi demonstrada apenas na fração IgG.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Avaliar a resposta imune humoral de indivíduos com periodontite crônica, periodontite agressiva, gengivite/periodontite leve e periodonto clinicamente sadio, pela reatividade sérica de IgG e subclasses e de IgA a antígenos de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277.

3.2 Específicos:

- ❖ Avaliar os níveis dos anticorpos reativos a antígenos do extrato sonicado bruto de *P. gingivalis* ATCC33277 e de sua fração IV, obtida após cromatografia de troca iônica, nos diferentes grupos.
- ❖ Comparar os níveis séricos dos anticorpos reativos ao extrato sonicado bruto de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, entre os diferentes grupos.
- ❖ Comparar os níveis séricos dos anticorpos reativos à fração IV do extrato sonicado ATCC33277, nos diferentes grupos.

4. METODOLOGIA

4.1 Delineamento do Estudo

Este estudo foi realizado com o propósito de investigar os níveis séricos de IgA, IgG total e subclasses reativas ao extrato sonicado de *Pg* ATCC33277, de indivíduos com idade entre 18 e 75 anos (inclusive), portadores de periodontite crônica, periodontite agressiva ou sem periodontite. A participação de todos os indivíduos envolvidos no estudo foi espontânea e voluntária em todas as etapas, com a assinatura do Consentimento Livre e Esclarecido, obedecendo aos critérios estabelecidos e com base na Resolução nº 196/96, do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Este estudo faz parte do projeto de pesquisa “Associação entre os Parâmetros Periodontais Clínicos e Imunológicos em Indivíduos Tratados de Doença Periodontal, em Terapia de Manutenção”, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana, sob protocolo nº 013/2002 (Anexo 01).

Todos os 89 indivíduos, 29 com periodontite crônica, 12 com periodontite agressiva, 22 com gengivite e 26 com periodonto clinicamente sadio, tiveram o seu periodonto examinado de acordo com os descritores clínicos periodontais de profundidade de sulco/bolsa (PIHLSTROM *et al.*, 1981), índice de sangramento à sondagem (AINAMO e BAY, 1976) e nível de inserção clínica (RAMFJORD, 1959). Os exames foram executados com sondas periodontais milimetradas tipo Willians (TRINITY, SP), por um único examinador devidamente calibrado e os dados anotados em ficha apropriada (Apêndice 02).

Os critérios de exclusão avaliados pela anamnese (Apêndice 01) e considerados para este estudo foram: história de doenças sistêmicas, gestação atual, tratamento

periodontal anterior, fumo atual ou anterior, uso de antibióticos e antiinflamatórios, respectivamente, nos seis e dois meses anteriores à coleta.

O diagnóstico periodontal foi feito com base nos Critérios para o Diagnóstico Clínico da Doença Periodontal do I Seminário de Periodontia em Saúde Coletiva da Universidade Estadual de Feira de Santana (GOMES-FILHO *et al.*, 2005). Estes critérios foram fundamentados nos critérios de diagnóstico recomendados por Lopez, Smith, Gutierrez (2002) e pela classificação proposta pela Academia Americana de Periodontia (AAP, 1999).

A) Classificação segundo a extensão:

- Periodontite localizada - quando o total de sítios com alguma perda de inserção fosse menor ou igual a 30%;
- Periodontite generalizada - quando o total de sítios com alguma perda de inserção fosse maior do que 30%.

B) Classificação segundo a severidade:

- Leve - quando a maior perda de inserção clínica fosse de 1 a 2 mm, tomando-se como referência a junção cimento-esmalte, em pelo menos um sítio.
- Moderada - quando a maior perda de inserção clínica fosse de 3 a 4 mm, tomando-se como referência a junção cimento-esmalte, em pelo menos um sítio.
- Severa - quando a maior perda de inserção clínica fosse maior ou igual a 5 mm, tomando-se como referência a junção cimento-esmalte, em pelo menos um sítio.

C) Classificação segundo o tipo de periodontite:

- Periodontite Crônica - indivíduo adulto que apresentasse uma quantidade de destruição consistente com a presença de fatores locais e o cálculo subgingival fosse um achado freqüente.

- Periodontite Agressiva - indivíduo adulto que apresentasse destruição óssea e perda de inserção rápidas, podendo ter agregação familiar. Exceto a presença de periodontite, o indivíduo era, por outro lado, clinicamente saudável. As quantidades de depósitos microbianos eram inconsistentes com a severidade da destruição tecidual periodontal. A forma generalizada usualmente afetava indivíduos com idade inferior a menores que 30 anos, porém poderiam ser mais velhos. A perda de inserção interproximal considerada generalizada teria que afetar no mínimo outros três dentes permanentes além dos primeiros molares e incisivos.

D) Classificação quanto ao diagnóstico:

- Portador de Gengivite: indivíduo que não preenchesse todos os critérios para presença de Periodontite e apresentasse vermelhidão gengival e sangramento ao estímulo em mais de 25% dos sítios.

- Portador de Periodontite: indivíduo que apresentasse quatro ou mais dentes com um ou mais sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 4 mm, com perda de inserção clínica maior ou igual a 3 mm no mesmo sítio**, e presença de sangramento ao estímulo.

Os indivíduos foram categorizados em quatro grupos, demonstrados no quadro 2. Aqueles que apresentavam periodontite de severidade Leve foram agrupados com os portadores de gengivite.

Quadro 2: Critérios para o diagnóstico clínico da Doença Periodontal.

	Profundidade de Sondagem (mm)	Nível de Inserção Clínica (mm)	Sangramento ao estímulo	Presença de fatores locais X Destruição tecidual	Extensão da perda de inserção
Periodontite crônica generalizada (moderada ou severa) (PC) n=29	≥4	≥3	Presente	Consistente	>30% dos sítios
Periodontite agressiva generalizada (PA) n=12	≥4	≥3	Presente	Inconsistente	Afetando no mínimo outros 3 dentes permanentes, além dos molares e incisivos
Gengivite/Periodontite leve (GP) n=22	<4	<3	>25% dos sítios	-	-
Periodonto Clinicamente Sadio (PS) n=26	<4	-	≤ 25% dos sítios	-	-

Adaptado de Gomes-Filho *et al.*, 2005

A resposta imune dos indivíduos foi avaliada por ensaio imunoenzimático e Western Blotting para a verificação dos níveis de anticorpos séricos reativos ao extrato sonificado bruto e algumas frações antigênicas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, obtidas por cromatografia.

4.2 Coleta de Sangue/Obtenção de Soro

O sangue foi coletado num volume de 5mL, por punção venosa na fossa antecubital com tubo tipo Vacutainer estéril (BD-SP) sem adição de anticoagulante. Depois de coagulado o sangue, o tubo foi centrifugado a 3800 rpm (1800xg) por 15 minutos. O sobrenadante foi armazenado em alíquotas em tubos tipo eppendorfs a -20° C.

4.3 Preparação dos antígenos

4.3.1 Cultivo do *P. gingivalis* ATCC 33277

Foi utilizada a cepa de *P. gingivalis* ATCC 33277, cedida pelo Laboratório de Anaeróbios do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), mantida em freezer a -86°C. A cepa foi ativada por semeadura em placas

de ágar sangue suplementado com hemina e menadiona (Anaerinsol – PROBAC) e incubada em jarra de anaerobiose sob uma atmosfera de 85% de nitrogênio e 5% de dióxido de carbono, em estufa bacteriológica a 37°C por cinco dias. Neste período, foi observada a pigmentação negra das colônias, cuja pureza foi controlada com a realização de coloração pelo método de Gram e teste respiratório (anaerobiose, aerobiose e microaerofilia). Para determinar a curva de crescimento bacteriano, utilizou-se o protocolo descrito por Silva (2001), obtendo-se um crescimento do *P. gingivalis* no final da fase Log e início da fase estacionária. Depois de ativadas, as colônias foram então repicadas para crescimento, transferindo-se as colônias da placa para um balão volumétrico com 50mL de caldo Brucella suplementado com extrato de levedura 0,5%, hemina 0,1%, menadiona 0,1% e L-cisteína 0,05%, sendo incubada a 37°C, nas mesmas condições de anaerobiose citadas. Após 48h, um volume de 25 mL deste pré-inóculo (10% do volume final) foi semeado em 225 mL de caldo Brucella e cultivado nas mesmas condições anteriores por 30 horas, tempo correspondente ao final da fase Log (SILVA, 2001). Novamente foram realizados coloração de Gram e teste respiratório, para confirmar a pureza do crescimento bacteriano.

O conteúdo cultivado em balão (250mL) foi centrifugado a 8000xg, por 30 minutos a 4°C, e lavado duas vezes com salina tamponada com fosfato (STF) 0,15M, pH7,4. Após a segunda lavagem e centrifugação, o peso úmido da massa bacteriana foi calculado em balança de precisão.

4.3.2 Preparo do extrato sonicado de *P. gingivalis* ATCC 33277

A massa de *Pg* foi então ressuspensa em 20mL de STF e transferida para um tubo tipo Falcon, com coquetel inibidor de protease (Sigma P8465), na concentração de 5mL/g e submetida a ultrassom (Ultrasonic Processor), em ondas contínuas de 60Hz, com dez ciclos de um minuto, e intervalo de um minuto entre os ciclos, em banho constante de

gelo. O lisado foi centrifugado a 13000xg por 30 minutos, a 4°C e filtrado em membrana de nitrocelulose (Millipore), com 0,22µm e 12mm de diâmetro. Os sobrenadantes foram armazenados em tubos tipo Eppendorfs a -20°C. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry modificado (Bio-Rad, USA), sendo utilizada albumina sérica bovina como proteína padrão, conforme recomendado pelo kit.

4.3.3 Obtenção das frações antigênicas de *P. gingivalis* ATCC 33277 por FPLC

O extrato sonificado de *P. gingivalis* foi cromatografado em coluna monoQ – HR5/5 FPLC (“Fast Performance Liquid Chromatography, PHARMACIA, Suécia), com radical sulfidríla. Foram obtidos seis frações em diferentes concentrações de tampão fosfato 50 mM: fração 01 (1° pico) - 0%, fração 02 (2° pico) - 10%, fração 03 (3° pico) - 20%, fração 04 (4° pico) - 30%, fração 05 (5° pico) - 40% e fração 06 (6° pico) - 60%, posteriormente liofilizados. Os líofilos foram então dialisados, por imersão em água destilada dentro de bolsas com limite de exclusão de 12 000 a 16 000 kDa e porosidade de 25 Angstroms (INLAB, Brasil) por uma hora a 4°C, sob agitação, numa primeira etapa. A segunda etapa de diálise com STF foi realizada por duas horas, nas mesmas condições anteriores e repetida uma terceira vez. O material foi armazenado em alíquotas em tubos tipo Eppendorf, e a dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry modificado (Bio-Rad, USA). Após teste de antigenicidade, por ELISA e Western Blotting, das seis frações, foi selecionado o pico 4 para estudos subsequentes descritos a seguir.

4.4 Avaliação da antigenicidade do extrato sonificado bruto e das frações cromatográficas de *P. gingivalis* ATCC 33277.

4.4.1 Fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Após padronização e testes iniciais, o extrato sonificado bruto e as frações antigênicas correspondentes à fração quatro foram submetidos a eletroforese em gel descontínuo de

poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) em condições desnaturantes (SDS-PAGE). O gel de empilhamento foi preparado com concentração de 4%, contendo 29,2% e 0,8% de acrilamida-bisacrilamida, 10% de SDS, 0,05% de persulfato de amônio (PSA, MERCK), 0,05% de N'N'N'N-tetrametilenodiamina (TEMED – MERCK) em tampão trihidroximetilaminometano em HCl (Tris-HCl) 0,5M, pH 6.8. O gel de corrida a 12% foi preparado com acrilamida-bisacrilamida (29,2% e 0,8%), 10% de SDS, 0,05% de PSA e 0,05% de TEMED em Tris-HCl 1,5M, pH 8.8. A corrida eletroforética foi realizada em tampão de migração preparado com Tris (MERCK) 0,124M, glicina 0,96M e 0,5% de SDS, pH 8.3, em corrente constante de 30mA.

A migração foi monitorada pelo azul de bromofenol presente no tampão de amostra, com medida das distâncias relativas (em centímetros) da migração do padrão de peso molecular. O valor de referência (Rf) e os pesos moleculares das proteínas foram determinados, conforme instruções fornecidas pelo fabricante do kit de padrão de peso molecular (Low-MW, BIO-RAD-EUA).

As amostras foram distribuídas em diferentes poços para posterior coloração e/ou eletrotransferência para o estudo subsequente de antigenicidade por Western Blotting. Nos poços que seriam utilizados para coloração com nitrato de prata, foram aplicados 5 µg de proteína/poço para cada fração, diluídas em tampão de amostra. Do padrão de peso molecular, foram adicionados 5 µL em um dos poços. A quantidade de proteínas do extrato bruto aplicada em tampão de amostra foi de 70µg; essas proteínas foram coradas com azul de Comassie. O volume do padrão de peso molecular (High-MW, BIO-RAD-EUA) utilizado foi de 10 µL/ poço. Foram aplicadas 12,7µg de proteína da fração IV para eletrotransferência.

As bandas protéicas da fração IV foram visualizadas através de coloração com nitrato de prata, segundo Blum *et al.* (1987), enquanto as frações do extrato sonificado

bruto foram coradas com azul de coomassie (R-250) a 0,1% (p/v), diluído em metanol a 40% e ácido acético a 10%.

Ambos os géis foram então fotografados. As amostras para transferência em papel de nitrocelulose (MILLIPORE) foram submetidas ao sistema eletroforético durante uma hora a 100 V, em tampão de transferência com pH8,3, composto de Tris 0,25M, glicina 0,193M e 20% de metanol (TOWBIN *et al.*, 1979).

4.4.2 Western Blotting

Depois da verificação da presença das frações antigênicas pela coloração com solução aquosa de vermelho de Ponceau a 0,2%, a membrana foi bloqueada com uma solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de detergente tween-20 (STF-T) e 5% de albumina sérica bovina (BSA), fração V (SIGMA-EUA), durante 15 horas. Após cinco lavagens com STF-T, a membrana foi cortada em tiras de 2mm, para serem incubadas individualmente durante 15 horas com soros de indivíduos portadores de periodontite crônica, periodontite agressiva, gengivite ou sadios, diluídos a 1:100 em STF-T contendo 0,5% de BSA. As tiras foram lavadas oito vezes com STF-T e incubadas por uma hora a 37°C com imunoglobulina anti-IgG humana produzida em coelho, conjugada com peroxidase (SIGMA A-8792), diluída em STF-T contendo 0,5% de BSA a 1:500. Novamente as tiras foram lavadas oito vezes com STF-T para posterior revelação da reação com uma solução de 0,3% de 4-cloro-1-naftol, diluída a 1:5 em STF, com 0,33 µL de peróxido de hidrogênio por mL de solução. A interrupção da reação foi feita com água destilada e as tiras foram secas e fotografadas. O cálculo do peso molecular foi feito por comparação da migração das amostras e do padrão, de acordo com o valor de referência (RF), descrito no sub-item anterior.

4.4.3 Ensaio Imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA)

Após padronização, placas de poliestireno de alta adsorção (COSTAR) foram sensibilizadas com 10µg/mL de proteína do extrato sonificado bruto e 5µg/mL da fração antigênica correspondente à fração quatro, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6. Foram aplicados 50µL/poço do antígeno diluído e as placas foram incubadas durante 15 horas, a 4°C, em câmara úmida. O tampão de lavagem utilizado em todos os testes foi a salina tamponada com fosfato, contendo 0,05% do detergente tween-20 (STF-T) e o bloqueio foi efetuado com 200 µL/poço de uma solução de BSA 1% em STF-T, durante 2h em câmara úmida, a 37°C. Em cada tipo de ELISA realizado foi utilizada uma diluição da amostra e do conjugado, segundo padronização posteriormente.

Com exceção das análises para subclasses de IgG, todas as placas tiveram as suas reações reveladas utilizando-se 50µL/poço de solução reveladora composta de 10mL de tampão citrato-fosfato pH5,1, 4mg de ortofenilenodiamina (OPD-MERCK) e 4µL de H₂O₂ a 30%. Após incubação por 15 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, as reações foram interrompidas acrescentando-se 25µL/poço de H₂SO₄ 4N, procedendo-se em seguida a leitura das densidades ópticas (DO) em leitor de ELISA (DIASORIN) na faixa de 450 a 630nm.

Para cada modalidade de ELISA padronizada, foi feita a correção inter-placa da densidade óptica (DO), multiplicando-se o fator de correção entre placas (FtC) pela leitura da DO encontrada, de acordo com Zwirner *et al.* (1996). Portanto, a DO corrigida (DOc) foi obtida a partir da seguinte fórmula:

$$\text{FtC} = \frac{\text{média da D. O. do positivo-padrão da placa de referência}}{\text{média da D.O. do positivo-padrão de cada placa}}$$

Portanto, **DOc = DO X Fc**

A) ELISA para detecção de IgG sérica reativa ao extrato sonicado bruto e à fração IV de *P. gingivalis* ATCC33277.

Foram aplicados 50µL dos soros diluídos a 1:1000 em solução de STF-T contendo 0,5% de BSA, e as placas foram incubadas por 1h a 37°C, em câmara úmida. Após cinco lavagens, foram adicionados 50µL/poço de imunoglobulina de coelho anti-IgG humana, conjugada com peroxidase (Sigma A-8792), na diluição de 1:25000 por 1h a 37°C. Após incubação, o conjugado foi descartado e as placas lavadas por cinco vezes com STF-20. Procedeu-se a revelação e leitura das DO como descrito anteriormente.

B) ELISA para detecção de IgA sérica reativa aos extrato sonicado e fração IV de *P. gingivalis* ATCC33277.

Os soros diluídos a 1:50 (para a placa sensibilizada com o extrato sonicado bruto) e 1:100 (para a placa sensibilizada com a fração IV) em solução de STF-T contendo 0,5% de BSA foram aplicados nos poços e as placas foram incubadas por 1h a 37°C, em câmara úmida. Após cinco lavagens, foram adicionados 50µL/poço de imunoglobulina de cabra anti-IgA humana, conjugada com peroxidase (Bethyl A80-102P), nas diluições de 1:50000 (extrato sonicado bruto) e 1:25000 (fração IV) por 1h a 37°C.

C) ELISA para detecção de níveis séricos de subclasses de IgG reativos ao extrato sonicado e à fração IV de *P. gingivalis* ATCC33277.

Após padronização por diluição em bloco dos testes para subclasses, utilizou-se uma concentração final de 5µg e 2,5µg/poço do extrato bruto e da fração IV, respectivamente, em tampão já descrito, com 50µL/poço, permanecendo em incubação por 15 horas em câmara úmida, a 4°C. As diferentes diluições dos soros, do primeiro anticorpo (anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 ou anti-IgG4 humana, produzidas em camundongo, SouthernBiotech,

USA), do segundo anticorpo (anti-IgG de camundongo biotinizada, produzida em cabra, Zymed, USA) e da estreptavidina conjugada com peroxidase estão dispostos no quadro 2. A revelação foi realizada com tetrametil-benzidina, de acordo com as recomendações do kit (DAKO,USA) e a interrupção da reação foi feita com 25µL/poço de H₂SO₄ 2N. A leitura das DO foi feita como descrito anteriormente.

Quadro 3: diluições utilizadas nos ELISA para detecção de níveis séricos de subclasses de IgG reativas aos extrato sonicado e fração IV de *P. gingivalis* ATCC33277.

	Extrato Sonicado Bruto				Fração IV			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Soro	1:500	1:100	1:50	1:100	1:500	1:100	1:100	1:50
1 ^o anticorpo	1:2000	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:2000	1:2000	1:2000
2 ^o anticorpo	1:25000	1:25000	1:25000	1:25000	1:25000	1:25000	1:25000	1:50000
Estrepta vidina	1:7500	1:7500	1:7500	1:7500	1:7500	1:7500	1:7500	1:7500

4.5 Análise Estatística

No exame odontológico, apenas um examinador fez a medição de todos os descritores clínicos avaliados. A sua calibração foi verificada através de teste estatístico Kappa, com o objetivo de evitar possíveis variações de medida.

Uma vez verificado que as variáveis estudadas não tinham distribuição normal, optou-se pela utilização de testes estatísticos de distribuição livre ou testes não paramétricos. Para a comparação dos grupos quanto à tendência central dos dados, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, que comparou as diferenças das medianas das densidades ópticas nos testes de ELISA. Nas situações onde houve significância estatística com o emprego do teste de Kruskal-Wallis, as tendências centrais dos grupos

independentes, dois a dois, foram comparadas pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

O exame clínico periodontal foi considerado como padrão ouro (LOPES, 2000) e o valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05. Todas as análises dos dados obtidos foram feitas com o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 9.0 para Windows.

5. RESULTADOS

Os resultados deste estudo geraram um artigo científico que será submetido para publicação ao periódico **Journal of Periodontology** (Apêndice 04).

Algumas diferenças de imunorreatividade ao extrato sonicado bruto de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 e suas frações cromatográficas obtidas foram observadas durante a padronização dos testes com os soros dos pacientes. Das seis frações obtidas, a quarta fração ofereceu as melhores condições de especificidade. Foi observado o reconhecimento de bandas pelos “pool” de soros de indivíduos com periodontite crônica e com periodontite agressiva, enquanto que os indivíduos com periodonto clinicamente sadio não apresentaram qualquer reconhecimento.

O perfil eletroforético das duas preparações de *P. gingivalis* ATCC33277 está demonstrado na figura 1. O peso molecular das proteínas do extrato bruto variou de 164 a 10 kDa e o peso molecular das bandas protéicas da fração quatro variou de 43 a 15 kDa. O perfil de reconhecimento por IgG das bandas protéicas da fração quatro por western blotting está demonstrado na figura 2. O “pool” de soros de indivíduos com periodontite agressiva reconheceu seis bandas, com peso molecular de 58, 56, 50, 45, 37 e 35 kDa, enquanto o “pool” de soros de indivíduos com periodontite agressiva reconheceu bandas de 58, 54, 50, 45, 37 e 35 kDa. Entretanto, na periodontite agressiva, a intensidade de

reconhecimento das bandas 45, 37 e 35 kDa foi visualmente menor, quando comparada com o reconhecimento na periodontite crônica. Nenhuma banda foi reconhecida pelo soro de indivíduos com periodonto clinicamente sadio.

Os resultados obtidos dos testes ELISA serão divididos em duas partes. Na primeira, será descrita a resposta imune humoral ao extrato sonicado bruto e na segunda, será descrita a resposta imune humoral à fração IV de *P. gingivalis* ATCC33277. A comparação do desempenho dos dois antígenos será feita durante a descrição dos dados, quando relevante.

5.1 Níveis Séricos de IgA, IgG e Subclasses Reativas aos Antígenos do Extrato Sonicado Bruto de *P. gingivalis* ATCC33277

As tendências centrais dos quatro grupos examinados no estudo –periodonto clinicamente sadio (PS), gengivite/periodontite leve (GP), periodontite crônica (PC) e periodontite agressiva (PA) foram comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos na resposta de IgA, IgG e IgG4 ($p < 0,001$) e IgG1 ($p < 0,01$) específicas para o extrato sonicado bruto de *P. gingivalis* ATCC33277, como observado nas figuras 3, 4 e 5. Entretanto, não houve diferença estatística nos níveis de IgG2 e IgG3 (Figura 5).

Os grupos foram comparados dois a dois pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whiney, naquelas situações onde foi encontrada significância estatística pelo teste de Kruskal-Wallis. O grupo PC apresentou níveis séricos de IgG total mais altos que os grupos PS ($p < 0,001$) e GP ($p < 0,01$), como demonstrado no quadro 4. Os indivíduos sadios tiveram resposta inferior à dos grupos GP ($p < 0,05$) e PA ($p = 0,001$), não havendo diferença apenas entre os grupos GP e PA (Quadro 4).

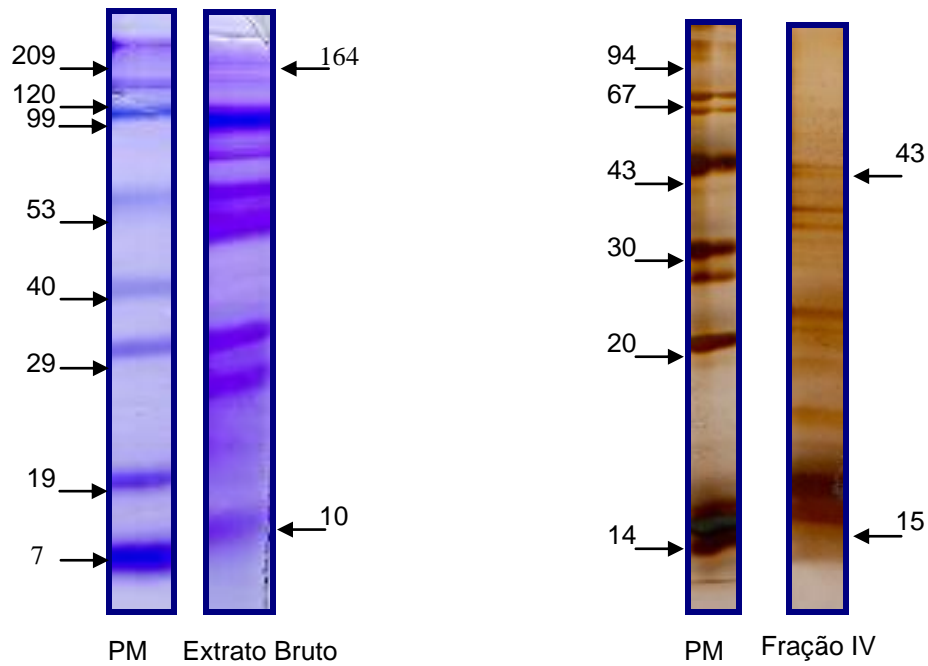


Figura 1: A) Perfil eletroforético do extrato sonicado bruto de *P. gingivalis* ATCC33277 (coloração com azul de Coomassie). B) Perfil eletroforético da fração IV, obtida após cromatografia do extrato sonicado bruto de *P. gingivalis* ATCC33277 em coluna Mono-Q (coloração com nitrato de prata).

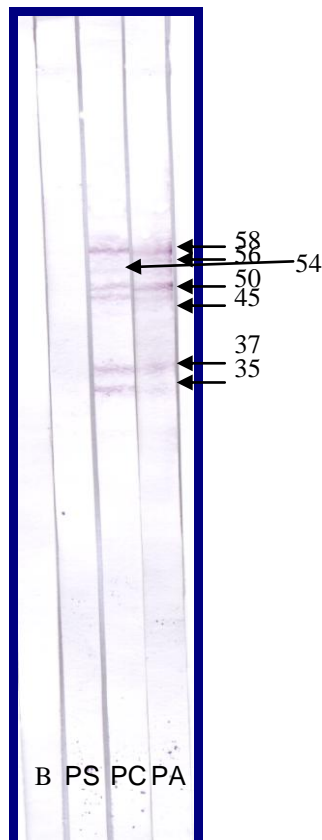


Figura 2: Perfil de reconhecimento sorológico por Western Blotting da fração IV do extrato sonicado de *P. gingivalis* ATCC33277. B: branco; SP: "pool" de soros de indivíduos saudios; PC: "pool" de soros de indivíduos com periodontite crônica; PA: "pool" de soros de indivíduos com periodontite agressiva.

Quadro 4: Níveis de significância (α) entre os grupos com periodonto clinicamente sadio (PS), gengivite/periodontite leve (GP), Periodontite crônica (PC) e periodontite agressiva (PA), referentes ao extrato sonicado bruto de *Pg* ATCC33277, obtidos pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney.

	PS X GP	PS X PC	PS X PA	GP X PC	GP X PA	PC X PA
IgA	p=0,001	p<0,001	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
IgG	p<0,05	p<0,001	p=0,001	p<0,05	p>0,05	p>0,05
IgG1	p<0,01	p<0,01	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
IgG2	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
IgG3	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
IgG4	p<0,05	p<0,001	p<0,05	p<0,01	p>0,05	p<0,05

Figura 3: Níveis de IgA reativa ao extrato sonicado bruto (A) e à fração IV (B) de *Pg* ATCC33277 avaliados por ELISA indireto.

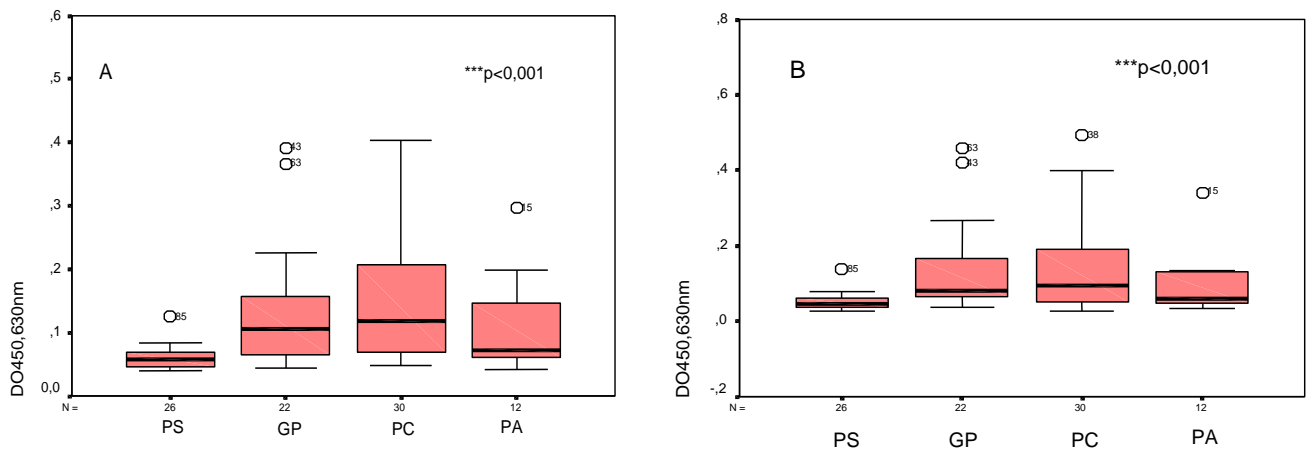


Figura 4: Níveis de IgG reativa ao extrato sonicado bruto (A) e à fração IV (B) de *Pg* ATCC33277 avaliados por ELISA indireto.

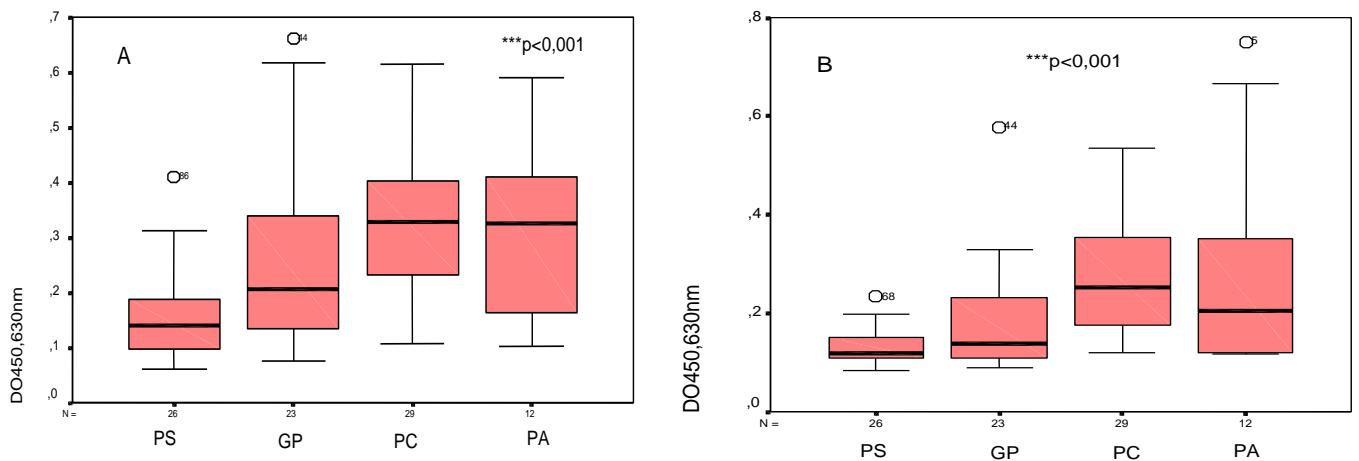


Figura 5: Reatividade sorológica ao extrato sonicado bruto de *Pg* ATCC33277 avaliada pondireto: níveis de IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) e IgG4 (D).

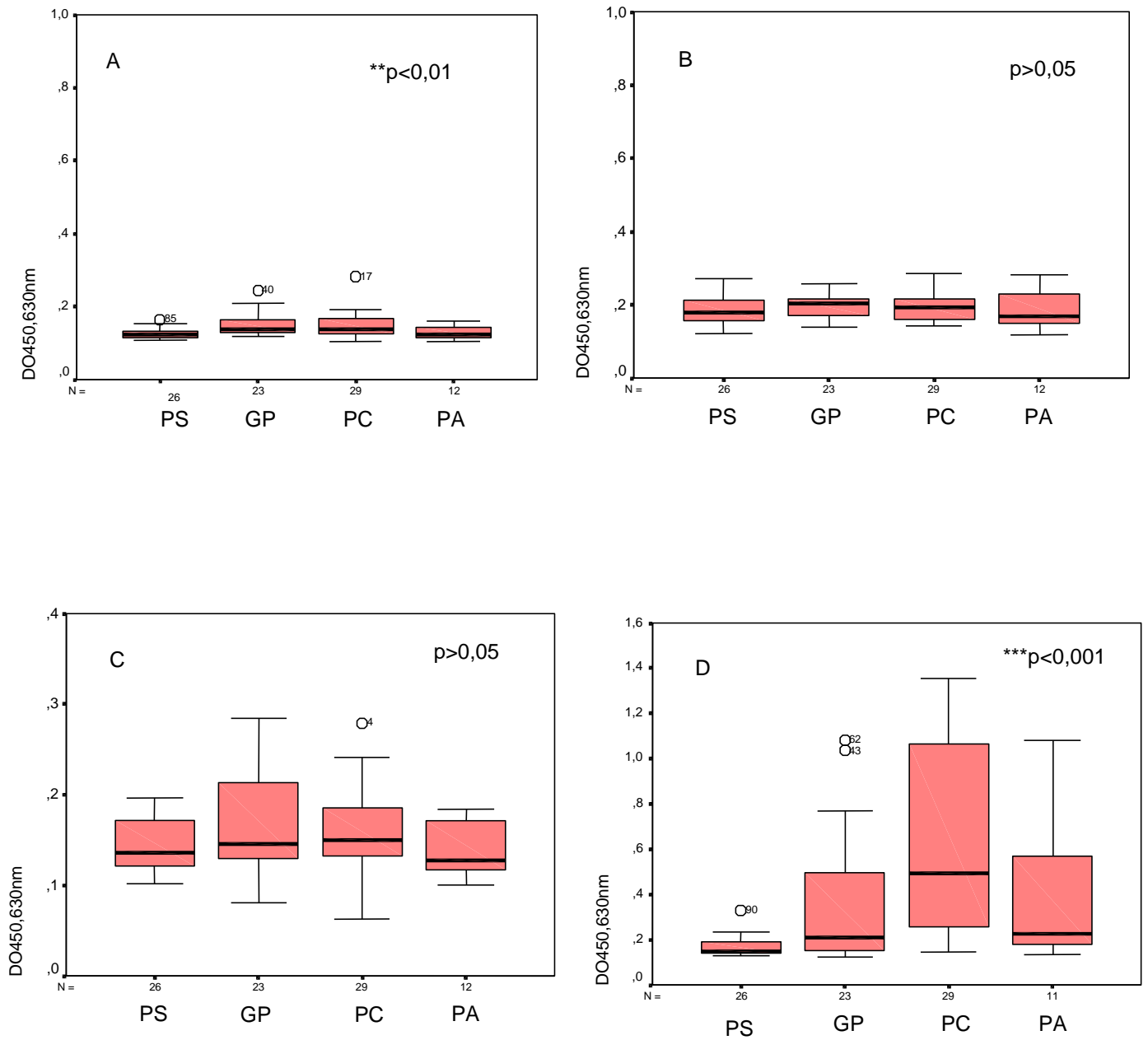
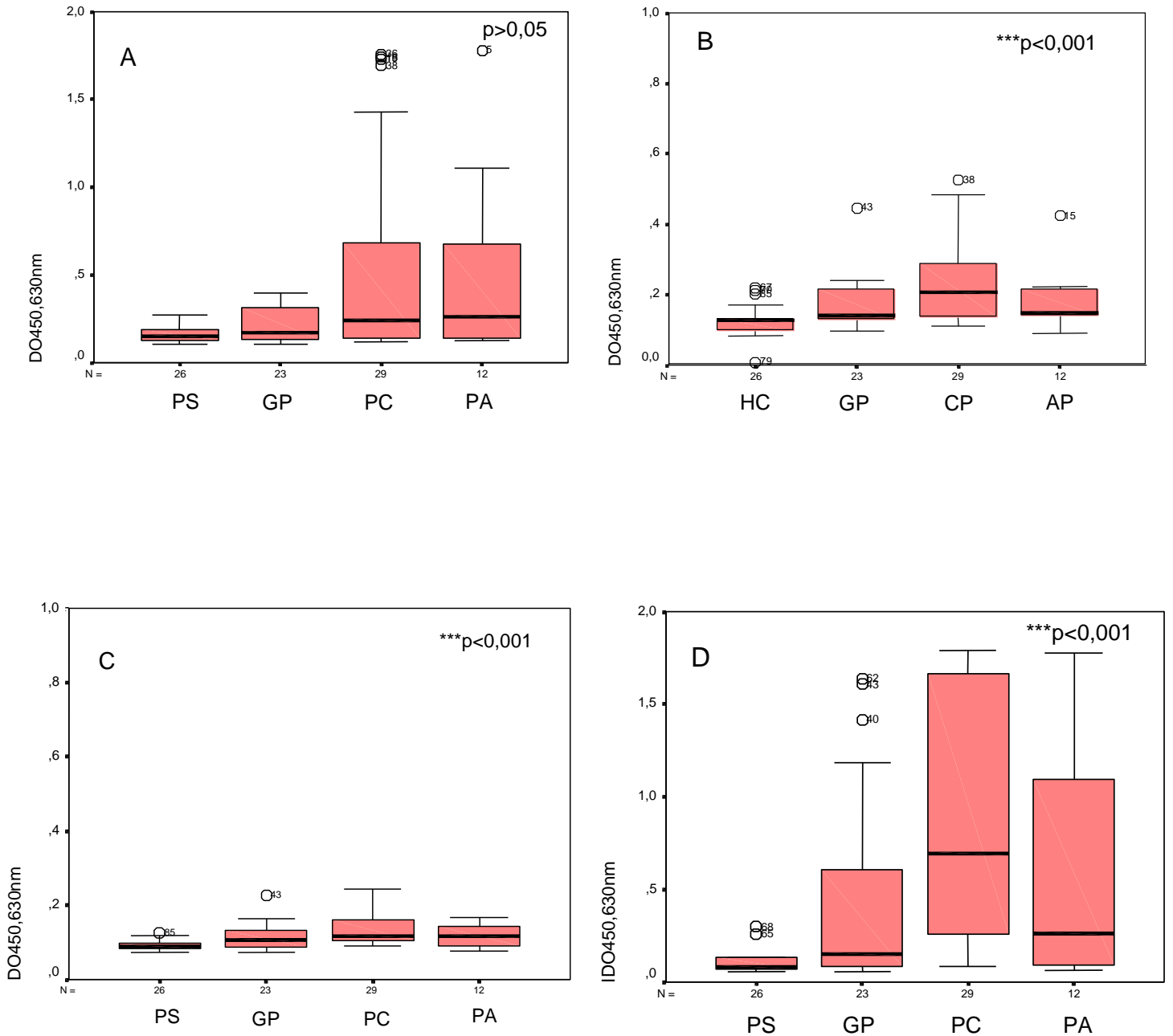


Figura 6: Reatividade sorológica à fração IV do extrato sonicado bruto de *Pg* ATCC33277 avaliada por ELISA indireto: níveis de IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) e IgG4 (D).



Como demonstrado na figura 5, a presença de IgG1 reativa ao extrato sonicado bruto foi maior nos grupos PC e GP que no grupo PS ($p < 0,01$). Foram detectados níveis mais elevados no grupo PA que no grupo GP ($< 0,05$). O grupo PC apresentou valores mais elevados que o grupo PA ($P < 0,05$), como demonstrado no quadro 4. Quando avaliada a presença de IgG4, o grupo PC teve maior desempenho em relação aos grupos PS ($p < 0,001$), GP ($p < 0,01$) e PA ($p < 0,05$). Os soros dos indivíduos dos grupos GP e PA também produziram mais IgG4 reativa ao extrato sonicado bruto que os do grupo PS ($p < 0,05$). Os níveis séricos de IgA reativa ao extrato bruto foram maiores nos grupos PC ($p < 0,001$) e GP ($p < 0,01$), quando comparados ao grupo PS (Figura 3).

5.2 Níveis Séricos de IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgA com Reatividade aos Antígenos da Fração IV do Extrato Sonicado de *P. gingivalis* ATCC33277

Empregando-se o teste de Kruskal-Wallis, para a comparação das tendências centrais das densidades óticas dos quatro grupos estudados, foi constatada diferença estatística nos níveis de IgA, IgG, IgG2, IgG3 e IgG4 ($p < 0,001$), como observado nas figuras 3, 4 e 6. Analisando dois grupos independentes por vez, pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney, pôde-se constatar que os níveis de IgG específica para a fração IV foram mais elevados no grupo PC que nos grupos PS ($p < 0,001$) e GP ($p < 0,01$). O desempenho da fração IV para a avaliação de IgG total foi superior ao do extrato bruto, uma vez que o poder do teste na comparação entre os grupos PC e GP aumentou ($p < 0,01$ contra $p < 0,05$, respectivamente). Como demonstrado na figura 4, o grupo PA também apresentou níveis mais altos que o grupo PS ($p < 0,01$). Não houve diferença estatística entre os grupos GP e PS.

Das subclasses estudadas, as variações das densidades ópticas obtidas com os ELISA para detecção de IgG4 apresentaram as melhores condições de discriminação entre os grupos (Quadro 5): foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GP e PS ($p < 0,05$), PC e PS ($p < 0,001$), PA e PS ($p < 0,05$) e PC e GP ($p < 0,01$). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos PC e PA, como observado na avaliação dos níveis de IgG4 reativa ao extrato sonicado bruto.

A produção de IgG1 foi maior apenas no grupo PC, quando comparado ao grupo PS ($p < 0,01$); os grupos PS e GP não apresentaram diferença estatística entre si, como pode ser observado na figura 6. Está demonstrado no quadro 5 que, nos indivíduos sadios, a resposta de IgG2 e IgG3 foi menor que nos grupos GP ($p < 0,01$ e $p < 0,05$), PC ($p < 0,001$) e PA ($p < 0,01$ e $p < 0,005$).

Os níveis de IgA foram maiores apenas nos grupos PC e GP quando comparados ao grupo PS ($p < 0,001$) (Figura 3).

Quadro 5: Níveis de significância (α) entre os grupos com periodonto clinicamente sadio (PS), gengivite/periodontite leve (GP), Periodontite crônica (PC) e periodontite agressiva (PA), referentes à fração IV extrato sonicado de *Pg* ATCC33277, obtidos pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney.

	PS X GP	PS X CP	PS X AP	GP X CP	GP X AP	CP X AP
IgA	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
IgG	$p > 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
IgG1	$p > 0,05$	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
IgG2	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
IgG3	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
IgG4	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

6. DISCUSSÃO

A doença periodontal tem sido referida como de etiologia multifatorial, que apesar de ser desencadeada por microrganismos bacterianos periodontopatogênicos, apresenta em diferentes indivíduos, fatores agravantes intrínsecos e extrínsecos.

As imunoglobulinas são glicoproteínas com função de anticorpo, presentes nos fluidos biológicos e estão associadas a diferentes funções *in vivo* e *in vitro*, exercendo papéis importantes na patogênese, diagnóstico, terapia e prevenção de doenças. As diferentes classes de imunoglobulinas apresentam diversas concentrações nos diferentes fluidos, assim como distintas funções biológicas, que favorecem ou dificultam uma dada patogênese, uma vez que a imunoglobulina pode lesar o patógeno ou facilitar a lesão de um tecido por sua atividade opsonizante e por sua capacidade de ativar o sistema complemento.

A infecção bacteriana mista que desencadeia a doença periodontal estimula uma resposta imune inata, com a participação de fatores plasmáticos, produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, metaloproteinases da matriz e prostaglandinas. A resposta imune adaptativa parece ser dependente do tipo de resposta inata estimulada durante a infecção.

Em geral, de acordo com Gemmel e Seymour (2004), se a resposta inata for fraca, são produzidos baixos níveis de IL-12 e, conseqüentemente, uma resposta Th1 também fraca pode ser gerada, podendo não conter a infecção. A produção de IL-4 e ativação de mastócitos levariam a uma resposta Th2, com ativação de linfócitos B e produção de anticorpos. Se estes anticorpos produzidos forem protetores e conseguirem debelar a infecção, a doença não progride, mas se não forem protetores, a lesão persiste e a ativação continuada de células B resulta em grandes quantidades de IL-1 e destruição tecidual.

A análise do perfil de reconhecimento dos antígenos preparados com a fração IV por Western blotting mostrou uma reatividade de IgG em “pool” de soros de indivíduos com periodontite crônica (bandas de 58, 54, 50, 45, 37 e 35 kDa) e periodontite agressiva (bandas de 58, 56, 50, 45, 37 e 35 kDa). As bandas de 45, 37 e 35 kDa foram reconhecidas com menor intensidade pelos indivíduos com periodontite agressiva com relação aos indivíduos com periodontite crônica. Os indivíduos sadios não reconheceram qualquer banda. Esses dados sugerem a presença de componentes imunodominantes importantes na interação entre o microrganismo e o hospedeiro, na patogênese da doença periodontal.

De acordo com Page (1994), alguns indivíduos sadios possuem níveis de IgG anti-*Pg* comparáveis aos dos indivíduos doentes. É provável que uma reação cruzada entre espécies interfira na detecção de uma resposta humoral específica (KAWAI *et al*, 1998). Avaliando o perfil de imunorreatividade sérica ao extrato sonicado de *Pg* ATCC33277, Franca (2003) observou que os soros de pacientes com periodontite crônica reagiram mais freqüentemente com frações protéicas de alto peso molecular (aproximadamente 103, 86, 72, 60, 58 e 52 kDa), enquanto os soros de indivíduos controle (com periodonto sadio ou com gengivite) reagiram com proteínas de menor peso molecular (39, 31 e 36 kDa). A detecção de antígenos imunodominantes pode ser útil para o diagnóstico imunológico da periodontite.

Foram também padronizados e realizados ensaios imunoenzimáticos com placas sensibilizadas com o extrato bruto e com a fração IV. As amostras de soro dos indivíduos dos quatro grupos foram então reveladas com conjugados específicos para as diferentes classes e subclasses de anticorpos. As diferentes concentrações de cada isotipo IgA, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foram importantes para indicar uma base para as diluições na padronização dos testes de reatividade com os dois antígenos testados.

Segundo Henry (1999) e Cassidy (1974), as diferenças das classes subclasses de imunoglobulina variam com o sexo, raça e idade. Outra possibilidade para as diferenças encontradas são as cepas estudadas, a presença de imunógenos das bactérias que induzem a um perfil de resposta diferente. Quando analisada a resposta imune humoral ao extrato sonicado bruto, a produção de IgG total, IgG1, IgG4 e IgA foi diferenciada entre os grupos. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na produção de IgG2 e IgG3. Muitos estudos encontrados na literatura relataram um aumento na produção de IgG total no soro de indivíduos com periodontite crônica (MOONEY, 1995; UNSAL, 1996; DE NARDIN, KAWASHIMA, 2002; O'BRIEN-SIMPSON, 2000; PUSSINEN, 2002; ONOUE, 2003; FRANCA, 2003) e agressiva (ALBANDAR, 2001; KAWASHIMA, 2002).

Na proteção contra a colonização por microrganismos, o sistema imune exerce um papel essencial e um dos mecanismos envolvidos é a produção de anticorpos. *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria gram-negativa que possui fatores de virulência que também são imunogênicos e, portanto, podem estimular a produção de imunoglobulinas. Dentre esses antígenos, estão as gingipaínas (INAGAKI *et al.*, 2003; YONEDA *et al.*, 2003), o LPS (GUO *et al.*, 2000; SLANEY *et al.*, 2002; ONOUE *et al.*, 2003;) e as fímbrias (DE NARDIN *et al.*, 1991; KAWASHIMA e ISHIKAWA, 2002). A produção de anticorpos é dependente do antígeno envolvido no estímulo inicial da resposta imune, do perfil de resposta estimulado pela imunidade inata e isso reflete na resposta efetora para a eliminação deste antígeno.

A IgA tem características biológicas e funcionais diferentes das outras imunoglobulinas; não fixa complemento pela via clássica e não funciona como uma opsonina; a sua função mais definida é a neutralização, mas aparentemente também fixa complemento pela via alternativa. O seu papel na doença periodontal ainda não está bem definido, mas sua importância nos fluidos secretados e esta correlação com o soro

mostrou-se eficiente, uma vez que os dados obtidos no presente trabalho mostram diferença de reatividade de IgA sérica de indivíduos sadios e os do grupo PC, utilizando o extrato bruto e a fração IV. Além de ser a imunoglobulina mais abundante na saliva, em indivíduos sadios e doentes, os níveis de IgA parecem estar aumentados na saliva de indivíduos com periodontite agressiva (HAGEWALD, 2000) e no soro e fluido gengival de indivíduos com periodontite crônica (DE NARDIN *et al.*, 1991; CONDORELLI I *et al.*, 1998; BEICKLER *et al.*, 2003).

Além dos indivíduos do grupo PC, aqueles do grupo GP também apresentaram diferenças nos níveis séricos de IgA reativa ao extrato sonicado de *P. gingivalis* ATCC33277, quando comparados com indivíduos sadios. Wittstock *et al.*, em 1996, correlacionaram a reatividade de IgA sérica de indivíduos com periodontite, avaliada por imunoblot padronizado com uma sensibilidade e especificidade alta para antígenos de *P. gingivalis*, ao método de PCR para este patógeno.

É provável que a produção local de IgA ou a sua migração através do epitélio para as mucosas seja a forma de proteção mais efetiva desta imunoglobulina na periodontite, e por isso os seus níveis séricos não estejam aumentados nos indivíduos do grupo PA, como também demonstrado pelos achados de Albandar *et al.*, (2002) e Graswinckel *et al.*, (2004). Outra possibilidade importante a ser considerada é a natureza mista da infecção, e no caso particular dos indivíduos com periodontite agressiva, outros patógenos podem estar fortemente envolvidos, como o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), ou mesmo outros sorotipos de *Pg*. No grupo com periodontite crônica, foi observada uma maior produção de IgA quando comparada com a produção dos indivíduos com periodonto sadio, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os primeiros e aqueles portadores apenas de gengivite. É importante lembrar que os indivíduos com gengivite

retratam mais fielmente as condições necessárias para um grupo controle, uma vez que é raro encontrar indivíduos com periodonto sadio na população.

A IgG é o isótipo mais abundante no soro e existem quatro subclasses em humanos, que diferem quanto a sua estrutura e função (HAMMARSTRÖM e SMITH, 1986). A produção de IgG1 e IgG3 é estimulada por antígenos protéicos e gera uma potente resposta por diversos mecanismos, como ativação do complemento pela via clássica, opsonização, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, neutralização e sensibilização para morte por células “natural killer” (NK).

Os níveis de IgG1 dos indivíduos avaliados neste estudo foram maiores nos portadores de periodontite crônica e de gengivite que nos portadores de periodontite agressiva e com periodonto sadio; contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos PA e PS. Embora não tenha sido realizada uma análise microbiológica no periodonto desses indivíduos, é provável que o grupo PS apresente uma baixa reatividade devido ao pouco contato com o patógeno. Os indivíduos com periodontite agressiva podem ter apresentado níveis de IgG1 semelhantes aos do grupo PS também pelo pouco contato com o patógeno utilizado como antígeno no ELISA, mas a natureza mista da infecção, como já mencionado, permite supor que outros microrganismos, como o Aa, estejam mais envolvidos no desenvolvimento da doença neste grupo. São necessárias avaliações dos níveis de anticorpos com reatividade a outros periodontopatógenos, para corroborar esta hipótese. Outra questão a ser discutida é que na periodontite agressiva, mesmo havendo a infecção por *P. gingivalis*, outras subclasses de imunoglobulina G sejam produzidas em maior quantidade. Isto talvez explique a agressividade da progressão da doença, uma vez que, na ausência de IgG1, a resposta do sistema imune pode não estar sendo efetiva para a resolução do processo infeccioso e a destruição tecidual esteja sendo estimulada pela presença de mediadores como IL-1 e IL-6 (GEMMEL e SEYMOUR, 2004).

A resposta humoral na periodontite agressiva é caracterizada por uma maior produção de IgG2 com relação às outras subclasses (CHOI *et al.*, 1996; CALIFANO *et al.*, 1999; ISHIHARA *et al.*, 2001; CHUNG *et al.*, 2002; GRASWINCKEL *et al.*, 2004). Este achado não foi confirmado pelos resultados do presente trabalho, quando avaliada a reatividade sérica de IgG específica para o extrato sonicado de *Pg* ATCC33277. Segundo Tanaka (2003), a IgG2 ocorre tanto em respostas com perfil Th1 quanto Th2 quando se estimula a polarização com a presença de IFN- γ ou PGE₂, respectivamente. Estes autores associam a extensão e severidade reduzidas da doença em presença da IgG2. Por outro lado, antígenos timo-independentes, como o LPS de *Pg* estimulam a sua produção (OGAWA *et al.*, 1989)

A reatividade sérica de IgG4 nos indivíduos com periodontite crônica participantes deste estudo foi maior que a encontrada nos grupos PS, GP e PA. A IgG4 é caracteristicamente produzida em respostas imunológicas de perfil Th2, como nas reações alérgicas (ALBANDAR, *et al.* 2002), sob o estímulo da IL-4 e da IL-13. Não ativa complemento pela via clássica, mas promove citotoxicidade celular dependente de anticorpo e neutralização. A sua produção é controlada por células T auxiliares do tipo 2 (Th2) e está associada a uma estimulação crônica ou prolongada (JEFFERIS e KUMARARATNE, 1990). O LPS de *Porphyromonas gingivalis* é reconhecido pelo receptor do tipo Toll (TLR)-2 em associação com o TLR-6, gerando uma sinalização para a produção de uma resposta do perfil Th-2, diferentemente do LPS de outras bactérias, que é reconhecido pelo TLR-4 em associação com o CD14, estimulando uma resposta do tipo Th-1. Atualmente, não existe um consenso sobre a polarização da resposta imune na doença periodontal, com relação à predominância de células e citocinas do tipo Th1 ou Th2. Gemmel e Seymour (2004) sugeriram que as células com perfil Th1 podem ser os principais mediadores na lesão precoce e estável, enquanto na lesão avançada e

progressiva a predominância seria das células e citocinas do tipo Th2. As células Th1 e Th2 diferem em suas propriedades migratórias e responsividade quimiotática e citocinas podem regular a reação imune local por influência do equilíbrio Th1/Th2 (GEMMEL e SEYMOUR, 2004).

Na análise da reatividade sérica dos participantes do estudo à fração IV, por meio de ELISA, pôde-se observar uma diferença entre os grupos na produção de IgG, IgG2, IgG3, IgG4 e IgA. Diferentemente da avaliação com o extrato sonicado bruto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos apenas na produção de IgG1. Entretanto, na análise pareada, esta subclasse foi observada em níveis elevados nos indivíduos com periodontite crônica em relação ao grupo com periodonto sadio. O grupo G não apresentou diferença estatisticamente significativa do grupo S. Esta situação revela um grupo controle mais próximo à realidade da população brasileira sem perda de inserção clínica $\geq 3\text{mm}$, mas com inflamação gengival importante.

Os dados obtidos neste estudo revelam uma baixa reatividade de IgG à fração IV pelo soro de indivíduos dos grupos GP e PS. Embora não tenha sido avaliada a microbiota bucal dos voluntários testados, os dados disponíveis na literatura afirmam que indivíduos com esta situação clínica raramente abrigam *Pg* no biofilme subgengival (SOCRANSKY *et al.*, 1999), provavelmente pela influência de fatores ambientais, como o potencial de oxido-redução (Eh) em sítios periodontais saudáveis, desfavorável para a colonização de *Pg* ou qualquer outra bactéria anaeróbica (FRANCA, 2003). Já o grupo PC apresentou níveis mais elevados de IgG, revelando o papel essencial do *Pg* no desenvolvimento da doença. Não houve diferença entre a reatividade específica de IgG à fração IV dos grupos PC e PA, e a produção desta imunoglobulina na periodontite agressiva, embora não significativa, tendeu a ser maior que na gengivite. Estes achados indicam mais uma vez a importância

do patógeno no desenvolvimento da doença e a eficácia da fração IV para o reconhecimento sérico de indivíduos doentes.

Os níveis de IgA sérica encontrados neste estudo foram muito semelhantes entre os grupos. Apenas os indivíduos dos grupos PC e G apresentaram níveis mais altos que os do grupo S. Levando-se mais uma vez em consideração que os indivíduos com gengivite deveriam compor o grupo controle, parece que a produção sérica de IgA não é um bom parâmetro de avaliação da resposta do sistema imune à infecção por *Pg*. Uma explicação para os altos níveis de IgA sérica nos indivíduos com gengivite pode ser a reatividade cruzada com antígenos comuns a outros microrganismos. A avaliação da presença de IgA em outros fluidos biológicos, como saliva e fluido gengival, pode ser de maior valor na compreensão do seu papel no controle da infecção periodontal.

Os indivíduos com periodontite crônica apresentaram os níveis séricos mais elevados de IgG2 e IgG3 específicas para a fração IV, seguidos dos grupos PA, GP e PS. Entretanto, só foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos PC, PA e GP, quando comparados com o grupo PS. Os altos níveis de IgG2 e IgG3 anti-*Pg* no grupo GP podem ser atribuídos mais uma vez à reatividade cruzada, ou, ainda, à possibilidade destes indivíduos abrigarem ou terem adquirido transitoriamente o microrganismo, sem, contudo, apresentarem o diagnóstico clínico de periodontite.

A avaliação da reatividade sérica de IgG4 permitiu uma boa discriminação entre os grupos, com a maior produção encontrada novamente no grupo PC, seguida pelo grupo PA. O grupo com gengivite também apresentou níveis elevados de IgG4, enquanto no grupo PS foi observada a quantidade mais baixa. O grupo PC apresentou níveis significativamente mais elevados que os grupos GP e PS, condição esta que permite uma transposição mais fiel dos dados para a realidade. Apesar de não haver diferença estatística, foi observada uma tendência à maior produção de IgG4 pelo grupo PC em

relação ao grupo PA, concordando com Jefferis e Kumararatne (1990), que associam esta produção a uma estimulação crônica ou prolongada. Além disso, o grupo com gengivite também apresentou uma maior produção, quando comparado ao grupo PS, provavelmente por abrigar o patógeno sem ter desenvolvido os sinais clínicos da doença. Não é possível saber, com os meios de diagnósticos disponíveis atualmente, se estes indivíduos com gengivite permanecerão indefinidamente com esta condição ou se a ausência de sinais clínicos da doença significa uma etapa apenas transitória, na qual a resposta imune está montada, precedendo à destruição periodontal.

Em camundongos Balb/c, Baker *et al.* (1994) afirmaram que anticorpos séricos em resposta à infecção por *Pg* ATCC33277 precedem a perda óssea detectável e permanecem elevados quando a perda óssea aumenta, não prevenindo o seu início ou progressão. Pode ser que esses antígenos não sejam reconhecidos com grande afinidade e/ou avidéz pelo anticorpo, estimulando uma ativação policlonal de linfócitos B, com produção de mais anticorpos com baixa avidéz. Esta resposta pode não ser suficiente para o controle do processo infeccioso, mas pode estimular a produção e liberação de mediadores imuno-inflamatórios que promovem a destruição tecidual.

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e discutidos no presente estudo, pode-se concluir, nas condições estabelecidas e padronizadas:

- ❖ Existe diferença de antigenicidade entre o extrato sonicado bruto e a fração IV.
- ❖ Os níveis séricos de IgG e IgG4 reativas a ambos os antígenos e IgG3 reativa à fração IV permitiram discriminação entre os indivíduos com periodontite crônica e aqueles com periodonto sadio ou com gengivite/ periodontite leve.
- ❖ Os níveis séricos de IgG1 e IgG4 reativas ao extrato sonicado bruto permitiram discriminação entre os indivíduos com periodontite crônica e os indivíduos com periodontite agressiva.
- ❖ A IgG4 reativa ao extrato sonicado bruto permitiu as melhores condições de discriminação dos grupos, entre todas as imunoglobulinas avaliadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN A.H.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. WB Saunders Company, 5ed, 553p, 2004.
2. AINAMO, J; BAY, I. Periodontal indexes for and in practice. **Tandlaegeblader**, 1976; 80: 149-152.
3. ALBANDAR, J.M. *et al.* Associations between serum antibody levels to periodontal pathogens and early-onset periodontitis. **J Periodontol** 2001; 72: 1463-69.
4. ALBANDAR, J.M. *et al.* Associations of serum concentrations of IgG, IgA, IgM and interleukin-1 β with early-onset periodontitis classification and race. **J Clin Periodontol** 2002; 29: 421-426.
5. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Consensus Report. Chronic Periodontitis. **Ann Periodontol** 1999, 4:53.
6. ASHIMOTO, A. *et al.* Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol Immunol** 1996; 11:266-273.
7. BAKER, P.J. *et al.* Serum antibody response to oral infection precedes but not prevents *Porphyromonas gingivalis*- induced alveolar bone loss in mice. **Oral Microbiol Immunol** 1999: 14:194-196.
8. BARR-AGHOLME, M. *et al.* Periodontal conditions and salivary immunoglobulins in individuals with Down syndrome. **J Periodontol** 1998; 69: 1119-23.
9. BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. **Electrophoresis**, 1987;8:93–99.
10. CALIFANO J.F. *et al.* Antibody reactive with *Porphyromonas gingivalis* serotypes K1-6 in adult and generalized early-onset periodontitis. **J Periodontol** 1999; 70: 730-735.
11. CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Arned, 2003.
12. CASSIDY, J.T.; NORBY, G.L.; DODGE, H.J. Biologic variations of human serum immunoglobulin concentration: Sex and age specific effects. **J Chronic Diseases**, 1974; 27:507.
13. CHOI, J.; HÁ, M.; KIM, J.; KIM, S. Immunoglobulin allotypes and immunoglobulin G subclass responses to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in early-onset periodontitis. **Infection and Immunity**, 1996, 64: 4226-4230.

14. CHUNG, S.W. *et al.* Immune responses to heat shock protein in *P. gingivalis*-infected periodontitis and atherosclerosis patients. **J Periodont Res**, 2003; 38: 388-93.
15. CONDORELLI F. *et al.* Isolation of *Porphyromonas gingivalis* and detection of immunoglobulin A specific to fimbrial antigen in gingival crevicular fluid. **J Clin Microbiol**, 1998; 36:2322-2325.
16. DARVEAU, R.P. ; TANNER, A. ; PAGE, R.C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontol 2000**, 14:12-32, 1997.
17. DE CARLO, A.A. *et al.* Feasibility of an HA2 Domain-based periodontitis vaccine. **Infection and Immunity** 2003; 71: 562-566.
18. DE NARDIN, A.M. *et al.* Humoral immunity of older adults with periodontal disease to *Porphyromonas gingivalis*. **Infection and Immunity**, 1991; 59:4363-4370.
19. EBERSOLE, J.L.; HOLT, S.C. Serum antibodies to periodontopathic microorganisms: specific induction. In: **Periodontology Today**. Guggenheim B, Kargel B, 1988; 169-177.
20. FRANCA, M.P. Resposta imune humoral em indivíduos com periodontite crônica a antígenos de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277. Brasil. 2003. 94p. Dissertação (Mestrado em Imunologia), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
21. FREDRIKSSON, M.J. *et al.* Effect of periodontitis and smoking on blood leukocytes and acute-phase proteins. **J Periodontol** 1999; 70: 1355-60.
22. GEMMEL, E.; SEYMOUR, G.J. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. **Periodontology 2000**, 2004; 35:21-41.
23. GOLD, S.I. Periodontics: the past. Part (II). The development of modern periodontics. **J. Clin. Periodont**, 1985; 12: 171-189.
24. GOMES-FILHO, I.S. Avaliação longitudinal de um grupo de pacientes periodontais tratados com e sem terapia de manutenção. Bauru, 1993. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
25. GOMES-FILHO, I.S. *et al.* Critérios para o Diagnóstico Clínico da Doença Periodontal. **Ver Intern Period Clin**, abr-jun, 2005 (prelo).
26. GRASWINCKEL, J. *et al.* Plasma antibody levels in periodontitis patients and controls. **J Clin Periodontol** 2004; 31: 562-568.
27. GUO, S. *et al.* Antibody responses against *Porphyromonas gingivalis* infection in patients with early- onset periodontitis. **J Clin Periodontol** 2000;27:769-777.

28. HÄGEWALD, S. *et al.* Total IgA and *Porphyromonas gingivalis*-reactive IgA in the saliva of patients with generalized early-onset periodontitis. **Eur J Oral Sci**, 2002; 108:147-153.
29. HAMMARTRÖM, L.; SMITH, C.I.E. IgG subclasses in bacterial infections. **Monographs of allergy**, 1986; 19:122-133.
30. HENRY, J.B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 19ed, Manole, p.922, 1999.
31. HOSOGI, Y.; HAYAKAWA, M.; ABIKO, Y. Monoclonal antibody against *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin inhibits hemolytic activity. **Eur J Oral Sci** 2001;109:109-113.
32. HOUSTON, L.S. *et al.* Function of anti-*Porphyromonas gingivalis* immunoglobulin classes in immunized *Macaca fascicularis*. **Oral Microbiol Immunol** 1999,14:86-91.
33. INAGAKI, S. *et al.* Antibody responses of periodontitis patients to gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. **J Periodontol**, 2003; 74:1432-1439.
34. ISHIHARA, Y. Non-redundant roles for interleukin-1 β in regulating human IgG2. **J Periodontol**, 2001; 72:1332-1339.
35. JANEWAY, C.A. *et al.* **Immunobiology: the immune system in health and disease.** Current Biology Publications – Elsevier, 1999; 4ed.
36. JEFFCOAT, M.K.; REDDY, M.S. Progression of probing attachment loss in adult periodontitis. **J Periodontol**, 1991; 62: 185-189.
37. JEFFERIS, R.; KUMARARATNE, D. Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. **Clin and Exp Immunol**, 1990; 80:357-367.
38. KAWASHIMA, Y.; ISHIKAWA, I. Simple and rapid detection of serum antibody to periodontopathic bacteria by dot blotting. **J Periodont Res** 2002; 37:223-229.
39. KUBONIWA, M. *et al.* Specific antibodies to *Porphyromonas gingivalis* lys-gingipain by DNA vaccination inhibit bacterial binding to hemoglobin and protect mice from infection. **Infection and Immunity** 2001; 69:2972-2979.
40. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227:680-685.
41. LÖE ,H. *et al.* Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss attachment in Sri Lankan Laborers 14 to 16 years of age. **J Clin Periodontol**, 1986; 13: 431-440.
42. LOPEZ, N.J.; SMITH, P.C.; GUTIERREZ, J. Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. **J Dent Res**, 2002; 81:58 – 63.
43. LOPES, A.A. **Tópicos de Metodologia de Pesquisa.** 2000, 134p

44. MOONEY, J. *et al.* Initial serum antibody avidity and success of therapy for chronic periodontitis. **Infection and Immunity**, 1995; 63:3411-3416.
45. O'BRIEN-SIMPSON, N.M. *et al.* Serum immunoglobulin G (IgG) and IgG subclass responses to the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complex of *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. **Infection and Immunity**, 2000; 68:2704-2712.
46. OGAWA, T. *et al.* Bacteroides-specific IgG and IgA subclass antibody-secreting cells isolated from chronically inflamed gingival tissues. **Clin Exp Immunol**, 1989; 76:103-110.
47. OGAWA, T. *et al.* Analysis of human IgG and IgA subclass antibody-secreting cells from localized chronic inflammatory tissue. **J Immunol**, 1989; 142:1150-1158.
48. OGAWA, T. *et al.* *Bacteroides-gingivalis* specific serum IgG and IgA subclass antibodies in periodontal diseases. **Clin Exp Immunol**, 1990;82:318-325.
49. ONOUE, S. *et al.* Imai T, Kamuda H, Umemoto T, Kaca W, Isshiki Y, Kaneko A, Kaeahara K. Serum antibodies of periodontitis patients compared to the lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* **Microbiol. Immunol**, 2003; 47: 51-55.
50. PAGE, R.C. The humoral response in patients with periodontitis: effects of treatment and prospects for a vaccine. **Compendium 18** (Suppl.), 1994; S666-S671.
51. PAGE, R.C.; SCHROEDER, H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Lab Invest**, 1976; 33: 235-249.
52. PAGE, R.C.; SCHROEDER, H.E. Periodontitis in man and other animals: a comparative review. **Basel Karger**, 1982.
53. PAGE, R.C.; SIMPSON, D.M.; AMMONS, W. F. Host tissue response in chronic inflammatory periodontal disease. **J. Periodontol**, 46: 144-155, 1975.
54. PIETRZAK, E.R. *et al.* Characterization of serum antibodies to *Porphyromonas gingivalis* in individuals with and without periodontitis. **Oral Microbiol Immunol** 1998; 13: 65-72.
55. PIHLSTROM, B.L.; ORTIZ-CAMPOS, C.; MCHUGH, R.B. A randomized four-year study of periodontal therapy. **J Periodontol**, 1981; 52: 227-242.
56. PLOMBAS, M. *et al.*, Isotypic Antibody response to plaque anaerobes in periodontal diseases. **J Periodontol** 2002; 73: 1507-1511.
57. PUSSINEN, P.J. *et al.* Multiserotype Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as a Diagnostic Aid for periodontitis in Large-Scale Studies. **J Clin Microbiol**, 2002;.512-518.

58. RAMFJORD, S.P. Indices for prevalence and indice of periodontal disease. **J Periodontol**, 1959; 30:51-9.
59. SAITO, S. *et al.* Complement-mediated killing of *Porphyromonas gingivalis* 381 by immunoglobulin G induced by recombinant 40-kDa outer membrane protein. **Biochemical and Molecular Medicine** 1996; 58: 184-191.
60. SAKAI, Y. *et al.* *Porphyromonas gingivalis*-specific subclasses antibody levels as immunological risk indicators of periodontal bone loss. **J Clin Periodontol** 2001;28:853-859.
61. SCHLUGER, S.; YOUDELIS, R.A., PAGE, R.C. **Periodontia**. Rio de Janeiro, Interamericana, 1977.
62. SILVA, V.L. Aerotolerância de bactérias do gênero *Prevotella*. 2001. 96p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
63. SLANEY, J.M. *et al.* Recognition of the carbohydrate modifications to the RgoA protease of *Porphyromonas gingivalis* by periodontal patient serum IgG. **J Periodont Res** 2002;37;215-222.
64. SOCRANSKY, S.S. *et al.* New concepts of destructive periodontal disease. **J Clin Periodontol** 1984; 11: 21-32, 1984.
65. SOCRANSKY, S.S. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. **Periodontology** 2000, 1999; 20:341-362.
66. TABETA, K. *et al.* Elevated humoral immune response to heat shock protein 60 (hsp60) family in periodontitis patients. **Clin Exp Immunol** 2000; 120: 285-93.
67. TANAKA, S. *et al.* Prostaglandin E2-mediated regulation of immunoglobulin G2 via interferon gamma. **J Periodontol** 2003; 74: 771-79.
68. TONETTI, M.S.; MOMBELLI, A. Early-onset periodontitis. **Ann Periodontol** 1999: 39-54.
69. TOWBIN, H. STAEHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Nat Acad Sci**, 1979; 76; 4350-4354.
70. UNSAL, B.T. *et al.* Serum antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in juvenile periodontitis and adult periodontitis (part I). **J Marmara Univ Dent Fac**, 1996; 2:470-3.

71. WANG, P. *et al.* Effect of anti-CD14 antibody on experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. **JPN J Pharmacol** 2002; 89:176-183.
72. WHITNEY, C. *et al.* Serum immunoglobulin G antibody to *Porphyromonas gingivalis* in rapidly progressive periodontitis: titer, avidity, and subclass distribution. **Infection and Immunity** 1992; 60: 2194-2200.
73. WILTON, J.M.A.; HURST, T.J.; AUSTIN, A.K. IgG subclass antibodies to *Porphyromonas gingivalis* in patients with destructive periodontal disease. **J Clin Periodontol**, 1992; 19:646-651.
74. WITTSTOCK, M. *et al.* Serodiagnosis of *Porphyromonas gingivalis* infection by immunoblot analysis with recombinant collagenase. **J Clin Microbiol** 1996;34: 2411-2413.
75. YONEDA, M. *et al.* Antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* infection in a murine abscess model – involvement of gingipains and responses to re-infection. **J Periodont Res**, 2003; 38:551-556.
76. ZWIRNER, N.W. ELISA. In: MARGNI RA. **Imunología e Imunoquímica**. 5ed. Panamericana, 1996. Buenos Aires. 798-820.

Febre Reumática		Sim
Doença de Crhon		Sim
Colite Ulcerativa		Sim
Malária		Sim
Herpes		Sim

	Não
	Não
	Não
	Não
	Não

Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		Não

Já se submeteu a alguma destas cirurgias?

Amigdalectomia		Sim
Adenoidectomia		Sim
Apendicectomia		Sim
Esplenectomia		Sim

	Não
	Não
	Não
	Não

	anos
	anos
	anos
	anos

Já fez uso destes medicamentos pelo menos um mês/ano. Se sim qual a idade de início e qual a duração do uso?

Fenilbutazona		Sim
Corticoíde		Sim
Indometacina		Sim
Cloranfenicol		Sim
Imunossupressor		Sim
Amoxicilina		Sim
Metronidazol		Sim
Hormônios		Sim

	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não

	Idade-anos
	Idade-anos
	Idade-anos
	Idade-anos
	Idade-anos
	Idade-anos
	Idade-anos
	Idade-anos

	Duração-anos
	Duração-anos
	Duração-anos
	Duração-anos
	Duração-anos
	Duração-anos
	Duração-anos
	Duração-anos

Ultima vez que foi ao Dentista				O que realizou?					
Já fez Tratamento Periodontal?				Sim		Não		Em Trat.	Sim
Já fez Tratamento Ortodôntico?				Sim		Não		Em Trat.	Sim
Familia com Doença Periodontal				Sim		Não			

HÁBITOS DE HIGIENE ORAL

Quantas vezes escova seus dentes ao dia?

	1 vez
	2 vezes
	3 vezes ou +

Além da escova uso outro tipo de instrumento para limpar os dentes?

	Fio	
	palito	
	escova interdental	
	escova bitufo	
	bochechos	Qual?

O que você acha da sua condição bucal?

	Ótima
	Boa
	Ruim
	Não está preocupado com ela

Assinatura do Paciente:

Assinatura do Entrevistador:

APÊNDICE 03 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

**Autorizada pelo Decreto Federal N°77.498 de 27/04/76
Reconhecida pela Portaria Ministerial N° 874/86 de 19/12/86**

Eu, _____ abaixo assinado, entendi o trabalho de pesquisa desenvolvido na Clínica Odontológica da Cooperfeira /UEFS pelos profissionais que fazem parte do Programa de Manutenção Periodontal. Cada participante deste trabalho permitirá que as medidas sejam feitas em sua gengiva e que seja usada uma tira de papel para coletar o sangue, a saliva e o líquido que sai normalmente na gengiva, para que possam ser analisados posteriormente em um laboratório. Essas medidas são um meio empregado para fazer o exame da boca, não apresentando risco àqueles que participem do estudo, exceto algum desconforto por ficar de boca aberta. O objetivo deste trabalho é fazer uma ligação entre a doença de gengiva e algumas substâncias que poderão ser encontradas no sangue, gengiva e saliva. Sei que os resultados desta pesquisa poderão servir para outros dentistas entenderem quais são as pessoas que têm facilidade ou não de desenvolver a doença de gengiva, além de realizar um tratamento para o controle da doença de gengiva nas pessoas participantes deste estudo. Os dados obtidos serão confidenciais e de responsabilidade dos profissionais que trabalharão na pesquisa. Quando os resultados forem publicados, as pessoas não serão identificadas. Caso não seja a minha vontade participar do estudo, terei liberdade de recusar ou abandonar a participação, sem qualquer prejuízo para a continuação do meu tratamento. Além disso qualquer despesa decorrente da minha participação na pesquisa será paga pelos pesquisadores.

Feira de Santana, ____/____/____

Nome do Participante

Assinatura do Pesquisador

Pesquisador responsável: Soraya Castro Trindade

Endereço: Rua Milão, 1103 – Brasília/ Feira de Santana – BA
Telefones: (75) 221-1934 / (75) 9972-4399

Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* in chronic and aggressive periodontitis.

Trindade, S.; Gomes-Filho, I.; Meyer, R.; Nascimento, I.; Schaer, R; Moura-Costa L.; Vale, V.; Pugliese, L.; Botto, B.; Freire, S.

ABSTRACT:

Background: Periodontitis is an inflammatory oral disease caused by multifactorial intrinsic and extrinsic agents including Gram-negative bacteria, like *Porphyromonas gingivalis*. This study was undertaken to evaluate immunoglobulin A, Immunoglobulin G and immunoglobulin G isotype serum antibodies against *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277.

Methods: Were included 89 patients divided in four groups: 29 chronic periodontitis (CP), 12 aggressive periodontitis (AP), 22 gingivitis or mild periodontitis (GP), and 26 healthy controls (HC). Humoral response was assayed by ELISA to verify serum levels of IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 and IgA reacting to sonicated *P. gingivalis* ATCC 33277 crude extract and fraction IV obtained by chromatography.

Results: Serum levels of IgA, IgG ($p<0,01$), IgG2, IgG3 and IgG4 to the fraction IV were higher in CP group compared to healthy control. CP group had higher levels of IgG and IgG4 to both antigens than GP group and higher levels of IgG and IgG4 to sonicate than AP group. There were statistically significant differences in serum levels of IgG to both antigens ($p<0,01$), IgG2 to fraction IV ($p<0,01$), IgG3 to fraction IV ($p<0,05$) and IgG4 to both antigens ($p<0,05$) between AP and HC groups. IgG1 titers to sonicate were significantly elevated ($p<0,05$) in GP compared to AP group.

Conclusions: ELISA method to detect IgG and IgG4 to both antigens and IgG3 to fraction IV allow one to discriminate the groups, but IgG4 to fraction IV was the best for discriminating among groups. Antibody production in the aggressive periodontitis group was not regular with respect to the isotypes analyzed.

KEY WORDS

Chronic periodontitis, aggressive periodontitis, *Porphyromonas gingivalis*, Humoral immune response, antibodies, ELISA.

Periodontal diseases are a group of multifactorial infectious diseases caused by an adverse interaction between host-bacteria, in which periodontopathic Gram-negative, anaerobic and microaerophilic bacteria colonize the subgingival area. It has been suggested that *Porphyromonas gingivalis* is an important etiologic agent of periodontitis. However, the progression of the disease is not only dependent on the presence of the pathogen, but also on the host response pattern. Gingival inflammatory response to bacteria and bacterial products include leucocyte recruitment, accumulation of serum factors and release of pro-inflammatory cytokines (GEMMEL and SEYMOUR, 2004).

A major aspect of the adaptive host response in periodontitis is production of antibodies (Graswinckel *et al.*, 2004). Several studies have investigated the humoral response to the aforementioned pathogen and periodontal disease (Albandar *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2001). Specific IgG and IgA antibodies to *P. gingivalis* are higher in periodontitis patients than in healthy persons (Onoue *et al.*, 2003; De Nardin, 1991; O'Brien-Simpson, 2000). Ogawa *et al.* (1989) reported that IgG2 is the dominant subclass response against *P. gingivalis* LPS and that the IgG subclass distribution against a purified fimbrial protein was IgG3>IgG1>IgG2>IgG4. However, in an earlier report by the same group, the fimbria-specific IgG subclass distribution was found to be IgG4 dominant, followed by IgG1>IgG3>IgG2.

Numerous studies suggest that local IgA directed to oral microorganisms involved in the onset and development of periodontal disease has a protective role (Condorelli *et al.*, 1998; Plombas *et al.*, 2002). Serum levels of IgA specific to *P. gingivalis* can be elevated in periodontitis patients (De Nardin *et al.*, 1991; Beikler *et al.*, 2003).

Being acquainted with the importance of the different roles and biological functions of immunoglobulins in periodontal diseases, this study was undertaken to evaluate the specific humoral response to *P. gingivalis* by the serum reactivity of IgA, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4.

MATERIALS AND METHODS:

Study Population

Eighty nine subjects, ranging between 18 and 75 years of age were selected for this study. They had been diagnosed as having chronic periodontitis (CP, n=29), aggressive periodontitis (AP, n=12), gingivitis (GP, n=22) or being healthy (HC, n=26). They were selected at Dental Ambulatory of Feira de Santana State University according to the periodontal status measured by a periodontologist using a Williams calibrated periodontal probe (Trinity, SP). The following parameters were determined: probing depth, bleeding on probing, and clinical attachment level measurements. Subjects with any of the following conditions were excluded from the study: former periodontal treatment, use of systemic antibiotics in the previous 6 months, use of systemic antibiotics in the previous 2 months, systemic disease, and pregnancy.

Study subjects signed the informed consent form approved by the Ethics Committee of the Feira de Santana State University.

Disease Classification

The presence of 4 or more teeth showing one or more sites with probing depth 4 mm or higher, and with clinical attachment loss 3 mm or higher at the same site, was diagnosed as periodontal disease, according to López *et al.*, 2002, for the clinical definition of patients who positively and unequivocally exhibited periodontal disease.

Adult patients who exhibited tissue destruction status consistent with local factors, were diagnosed as chronic periodontitis, while patients who exhibited highly destructive forms of periodontitis, with periodontal status inconsistent with periodontal destruction were diagnosed as aggressive periodontitis (American Academy of Periodontology, 1999).

All the patients who did not fulfill all the criteria for periodontal disease, but showed gingival redness and bleeding on probing in more than 25% of a site, were diagnosed as having gingivitis or mild periodontitis (López *et al.*, 2002). Individuals without clinical attachment loss of and bleeding on probing in less than 25% of a site were considered healthy.

Preparation of Antigens

P. gingivalis ATCC33277 was grown in Brucella broth supplemented with 0.5% yeast extract, 0.1% hemin, 0.1% menadione and 0.05% L-cistein until late log phase, under anaerobic conditions (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) at 37°C. Harvested cells were washed with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) and centrifuged at 8,000g for 30 minutes three times. Cells were re-suspended in 20 mL PBS and then sonicated on ice at 60Hz (ten cycles for one minute). Unbroken cells were removed by centrifugation at 13,000g for 30 minutes.

Six fractions were obtained from *P. gingivalis* sonicate by ion-exchange chromatography on MonoQ column (Pharmacia-Biotech, Sweden). A column was attached to a Pharmacia gradient FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) system and the effluent was monitored at A₂₈₀ using a UV-M detector. Salt was removed by dialysis through distilled water at 4°C, under agitation. The elution profile of the proteins was monitored by measuring absorbance at 280nm. After antigenicity assays, fraction IV was chosen for late studies (see SDS-PAGE and Western Blotting).

Protein concentrations were determined by using a Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), with bovine serum albumin (BSA) as standard.

SDS-PAGE and Western Blotting

Proteins of crude sonic extract and fraction IV from *Pg* ATCC33277 were heated at 100°C for 5 min in a sample buffer and separated by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as described by Laemmli (1970). Sonicate Proteins from crude extract were revealed by Coomassie Brilliant Blue (CBB) and fraction IV protein by silver nitrate (SN) (BLUM *et al.*, 1987). Western blotting to nitrocellulose was performed according to Towbin *et al.* (1979). Non-specific binding was blocked by soaking the membrane in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and 5% BSA (Sigma, USA) overnight, at 4°C. Then, 2mm-wide nitrocellulose (Millipore, USA) strips were incubated with 1:100 diluted subject sera in PBS-T 0.5% BSA. After washing five times in PBS-T, strips were incubated with rabbit anti-human IgG conjugated with peroxidase (Sigma A-8792), diluted 1:500 for 1h, at 37°C. The presence of the bands was revealed by 4-chloro-1-naphthol

diluted 1:5 in STF, with 0.33 μL H_2O_2 / mL. The resulting reaction was stopped by adding water.

Serum Antibody Analysis

Blood samples were obtained from all individuals by venipuncture and serum was isolated. Serum antibodies reactive to crude sonic extract and fraction IV were measured by ELISA. In short, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *P. gingivalis* sonic extract or 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of fraction IV was coated on 96 well polystyrene microtiter plates (Costar, Corning, NY, USA) overnight at 4°C. After blocking with 1%BSA at 37°C for 2 hours, serum was diluted in PBS containing 0.05% BSA and then incubated at 37°C for 1 hour. Plates were subsequently washed and incubated at 37° for 1 hour with peroxidase-conjugate goat anti-human IgA (Bethyl A-80-102P), or peroxidase-conjugate rabbit anti-human IgG (Sigma A-8792), or mouse anti-IgG1-4 monoclonal antibodies followed by biotin-conjugated goat anti-mouse IgG and thereafter with streptavidin-peroxidase. Reactions were revealed with o-phenylene diamino (OPD) for IgG and IgA or tetramethylbenzidine (TMB) for IgG1-4 and stopped with H_2SO_4 4N and H_2SO_4 2N, respectively. The optical density (OD) at 450/630nm was then measured using a microplate reader (Diasorin, USA). After standardization for each isotype, dilutions of sera and reagents are shown in the following box.

Box 1: Dilutions of sera and reagents used in ELISA carried out in the study.

		Sera	Peroxidase conjugated IgA-IgG/ Monoclonal IgG1-4	Biotin-conjugated IgG	Streptavidin-peroxidase
Crude Sonic Extract	IgA	1:50	1:50,000	-	-
	IgG	1:1,000	1:25,000	-	-
	IgG1	1:500	1:2,000	1:25,000	1:7,500
	IgG2	1:100	1:1,000	1:25,000	1:7,500
	IgG3	1:50	1:2,000	1:25,000	1:7,500
	IgG4	1:100	1:1,000	1:25,000	1:7,500
Fraction IV	IgA	1:100	1:25,000	-	-
	IgG	1:1,000	1:25,000	-	-
	IgG1	1:500	1:2,000	1:25,000	1:7,500
	IgG2	1:100	1:2,000	1:25,000	1:7,500
	IgG3	1:100	1:2,000	1:25,000	1:7,500
	IgG4	1:50	1:2,000	1:50,000	1:7,500

Statistical Analysis

Medians were employed as a measure of central tendency as the data were non-normally distributed. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used for comparisons of ELISA $\text{OD}_{450/630}$ among groups. Differences in serum antibody levels between peered groups were assessed by Wilcoxon-Mann-Whitney U test. Statistical significance was considered for p values lower than 0.05. Clinical examination was considered as the gold standard.

RESULTS

There were some differences of immuno-reactivity to crude sonic extract from *P. gingivalis* ATCC 33277 and its fractions obtained by ion-exchange chromatography, observed during the standardization tests with patient sera. Of six fractions obtained, the fourth one had better specificity conditions, according to band frequency recognition by the pooled sera of chronic and aggressive periodontitis patients, and healthy control.

SDS-PAGE profiles of both preparations of *P. gingivalis* ATCC33277 are shown in Figure 1. Sonic extract protein molecular weights ranged from 164 to 10 kDa, while molecular weight of fraction IV ranged from 43 to 15 kDa. Western blotting recognition pattern showed the following pattern: pooled sera from chronic periodontitis patients recognized 58, 54, 50, 45, 37 and 35 kDa bands, and sera of aggressive periodontitis patients recognized 58, 56, 50, 45, 37 and 35 kDa bands. Antigens from fraction IV weren't recognized by healthy control pooled sera.

Humoral Response to Crude Sonic Extract from *Pg* ATCC33277 analyzed by ELISA

Central tendency of the $DO_{450/630nm}$ achieved in the four groups – aggressive periodontitis patients (AP), chronic periodontitis patients (CP), gingivitis patients (GP), and healthy control (HC) were compared by the Kruskal-Wallis test. There were significant differences among groups in serum response of IgA, IgG, IgG4 ($p < 0.001$), and IgG1 ($p < 0.01$) to crude sonic extract from *P. gingivalis* ATCC33277 (Figures 3,4 and 5). However there were no differences in the IgG2 and IgG3 levels (Figure 5).

CP group had significantly higher IgG responses than those of the HC ($p < 0.001$) and GP ($p < 0.01$) groups. HC group showed lower levels than GP ($p < 0.05$) and AP ($p = 0.001$) as shown in the Box 2.

Figure 5 shows specific IgG1 and IgG4 to crude sonic extract. IgG1 levels were significantly higher in CP and GP patients than in the healthy group ($p < 0.01$). Higher levels in AP than GP ($p < 0.05$), and in PC than in PA ($p < 0.05$) groups were detected. (Box 3). IgG4 presented the best condition of discrimination between groups: CP group had significantly higher response than HC ($p < 0.001$), GP ($p < 0.01$), and AP ($p < 0.05$). Sera of the individuals from groups GP and AP produced more IgG4 than HC group too ($p < 0.05$). IgG1 and IgG4 were the only immuno-globulins whose levels were discriminated between CP and AP groups. Serum levels of IgA were higher in CP ($p < 0.001$) and GP ($p < 0.01$) groups compared to healthy control (Figure 3).

Figure 3: Levels of IgA reacting to crude sonic extract (A) and fraction IV (B) from *Pg* ATCC33277 evaluated by indirect ELISA.

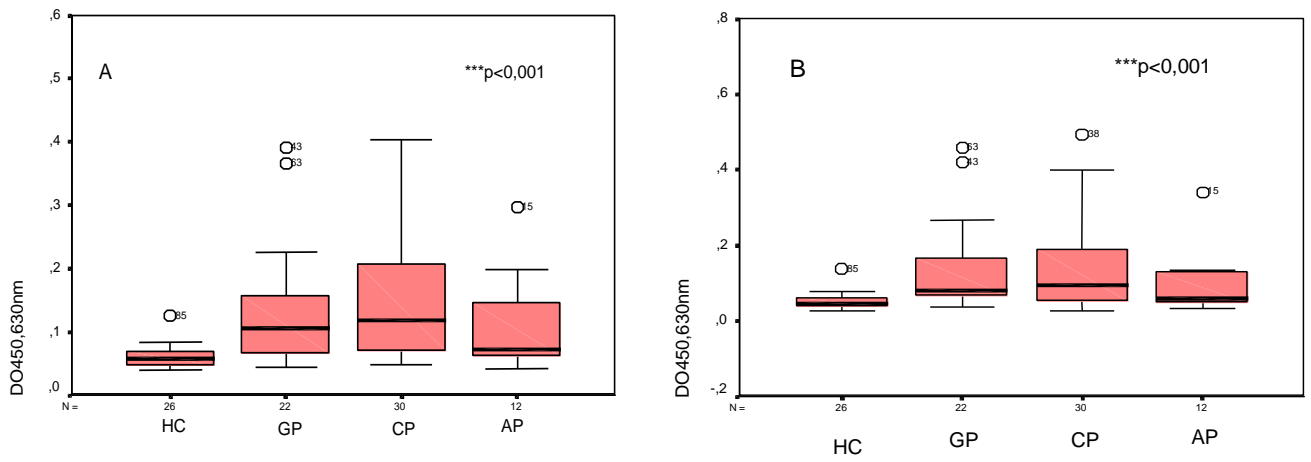


Figure 4: Levels of IgG reacting to crude sonic extract (A) and fraction IV (B) from *Pg* ATCC33277 evaluated by indirect ELISA.

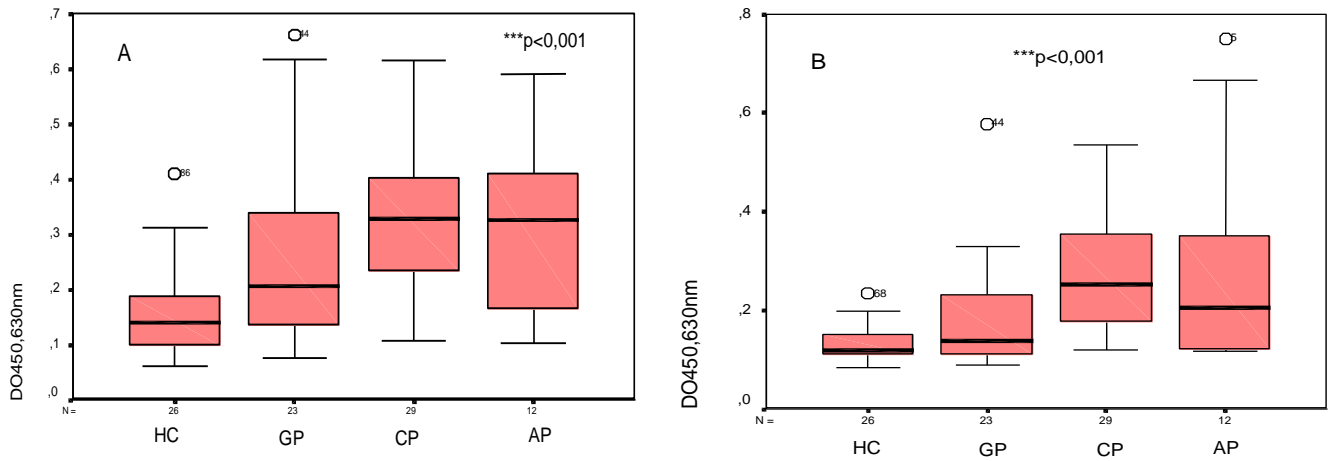


Figure 5: Serological reactivity to crude sonic extract from *Pg* ATCC33277 evaluated by indirect ELISA: levels of IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) and IgG4 (D).

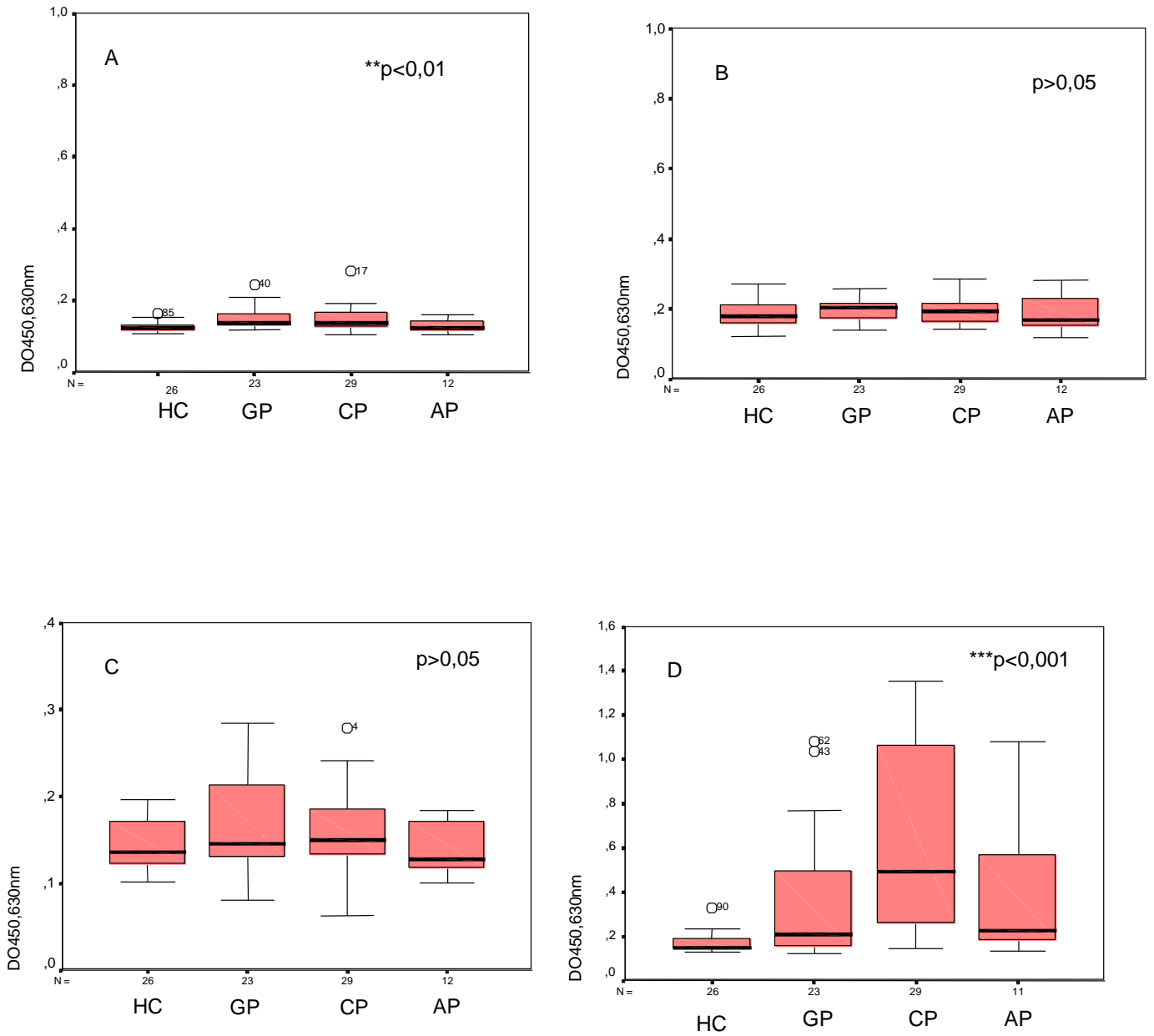
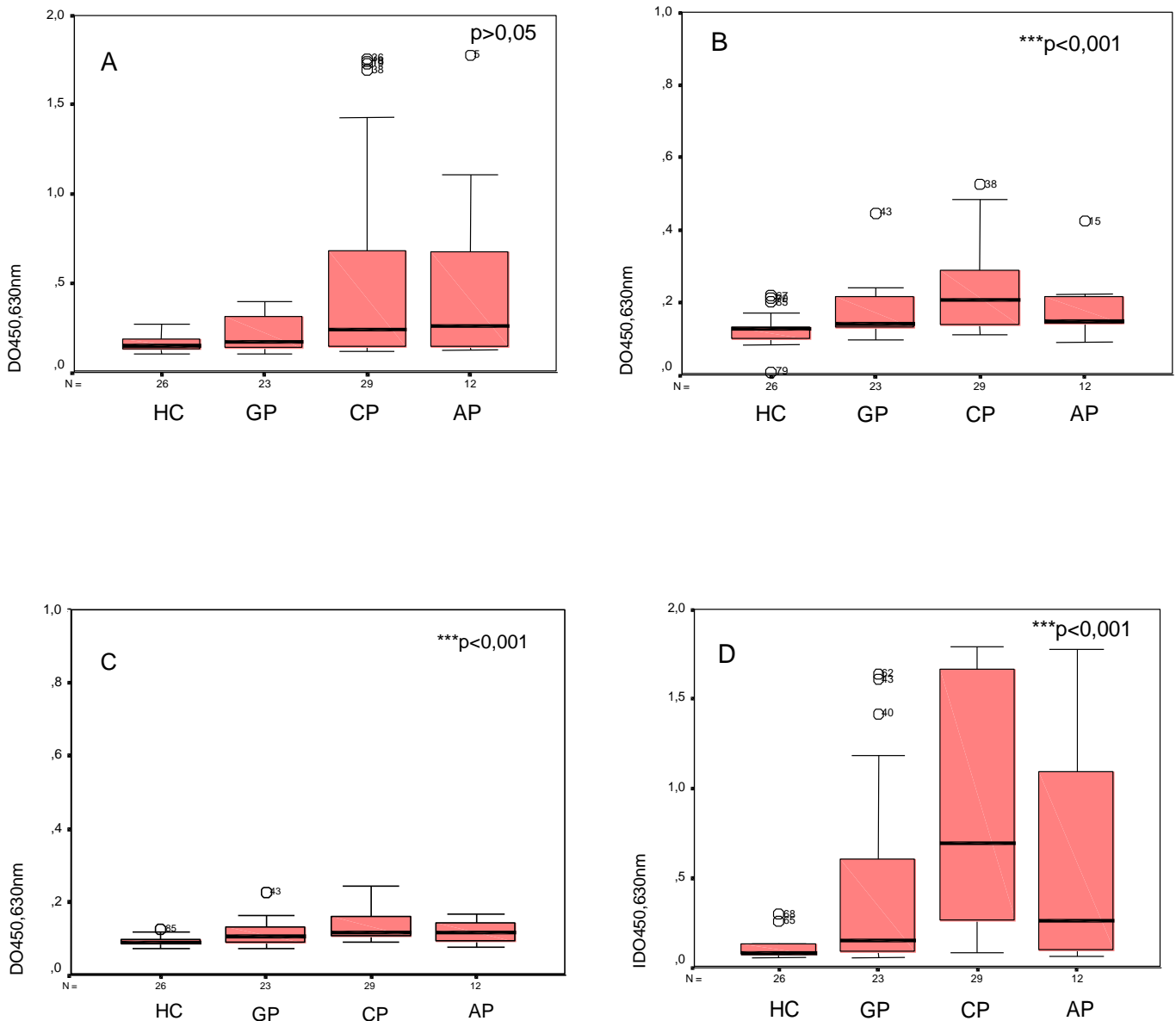


Figure 6: Serological reactivity to fraction IV of sonic extract from *Pg* ATCC33277 evaluated by indirect ELISA: levels of IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) and IgG4 (D).



Box 2: Significance levels (α) between groups: chronic periodontitis (CO), aggressive periodontitis (AP), gingivitis (GP) and healthy control (HC) obtained by Wilcoxon-Mann-Whitney U test, with respect to specific immuno-globulins for crude sonic extract from *Pg* ATCC33277.

	HC X GP	HC X CP	HC X AP	GP X CP	GP X AP	CP X AP
IgA	p=0.001	p<0.001	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
IgG	p<0.05	p<0.001	p=0.001	p<0.05	p>0.05	p>0.05
IgG1	p<0.01	p<0.01	p>0.05	p>0.05	p<0.05	p<0.05
IgG2	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
IgG3	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
IgG4	p<0.05	p<0.001	p<0.05	p<0.01	p>0.05	p<0.05

Humoral Response to Fraction IV from Sonic Extract of *Pg* ATCC33277 analyzed by ELISA

When the medians of DO_{450/630} were compared among the groups, there were statistically significant differences in IgA, IgG, IgG2, IgG3 and IgG4 levels ($p < 0.001$), as shown in Figures 6, 7 and 8. On the other hand, IgG1 levels were not similar among groups with no significant difference.

Peered analyses of groups showed that specific levels of IgG for fraction IV were higher in CP than HC ($p < 0.001$) and GP ($p < 0.01$). AP had higher levels than HC group ($p < 0.01$). ELISA for IgG reactive to fraction IV showed the best conditions for comparing chronic periodontitis and gingivitis/mild periodontitis patients. When the groups GP and HC were compared, there was no statistically significant difference. CP and GP groups had higher levels of IgA compared HC group ($p < 0.001$), without difference between CP and GP or AP (see Table 2).

According to the Wilcoxon-Mann-Whitney U test, when IgG4 was assessed, significant differences were observed between GP and HC ($p < 0.05$), CP and HC ($p < 0.001$), AP and HC ($p < 0.05$), and CP and GP ($p < 0.05$) as shown in table 4. ELISA for IgG4 reactive to fraction IV and sonic extract showed similar results for evaluating chronic periodontitis patients, but the test using the sonic extract remained more specific (84.6% against 76.9%), besides having lost sensitivity (73.3% against 90%). Specific IgG1 serum levels were statistically different only between CP and HC groups, with achieved ranks 970.5 and 569.5, respectively. Patients with chronic periodontitis showed slightly increased levels of IgG1 compared to healthy control, but even so there was no statistical significance.

When either specific IgG2 or IgG3 to fraction IV were evaluated, the healthy individuals had decreased levels compared to groups GP ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively), PC ($p < 0.001$), and PA ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively).

Box 3: Significance levels (α) between groups: chronic periodontitis (CO), aggressive periodontitis (AP), gingivitis (GP) and healthy control (HC) obtained by Wilcoxon-Mann-Whitney U test, with respect to specific immuno-globulins for fraction IV of sonic extract from *Pg* ATCC33277.

	HC X GP	HC X CP	HC X AP	GP X CP	GP X AP	CP X AP
IgA	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
IgG	$p > 0.05$	$p < 0.001$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
IgG1	$p > 0.05$	$p < 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
IgG2	$p < 0.01$	$p < 0.001$	$p < 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
IgG3	$p < 0.05$	$p < 0.001$	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
IgG4	$p < 0.05$	$p < 0.001$	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

DISCUSSION

Periodontal diseases are a complex multifactorial group of inflammatory diseases involving selected bacterial species recognized to function as “putative periodontal pathogens”. One might postulate that these bacterial species elicit innate immune responses, including cytokines, plasma factors, chemokines, matrix-metalloproteinases and

prostaglandins. The type of immune response that occurs on exposure to a pathogen is vital in determining the elicited adaptive immune response. The immune humoral response leads to the destruction of extra cellular microorganisms. This is achieved by antibodies secreted by B lymphocytes. If antibodies produced in response to periodontal pathogens were protective, elimination of the causative microorganism would ensue and disease progression would stop. Production of non-protective antibodies could, on the other hand, result in continual production of IL-1 and IL-6, and continual periodontal breakdown.

The present study was performed to evaluate the humoral immune response to crude sonic extract and fraction IV from *P. gingivalis* ATCC33277. When crude sonic extract was assessed CP group showed increased presence of total IgG compared to HC and GP groups. This current finding corroborates the observations by others (MOONEY, 1995; UNSAL, 1996; DE NARDIN, 1991; KAWASHIMA and ISHIKAWA, 2002; PUSSINEN, 2002; ONOUE, 2003; FRANCA, 2003), that in periodontitis one can expect a rise in systemic IgG levels. Graswinckel *et al* (2004) observed an elevation of total IgG in periodontitis patients, which increased with severity, but irrespective of whether the disease was of an aggressive or chronic form.

Levels of IgA for crude sonic extract from *P. gingivalis* were higher in CP and GP groups compared to HC. There was no difference between CP and GP groups. In addition, the present study corroborated that aggressive periodontitis subjects did not have an elevated production of IgA (ALBANDAR *et al.*, 2002; GRASWINCKEL, 2004). Presumably, local response is more effective in periodontal diseases. On the other hand, this could indicate either that other microorganisms elicit responses in periodontitis or that other strains of *Pg* could be involved.

Four subclasses of IgG have been identified in humans and these differ structurally and functionally (HAMMARSTRÖM e SMITH, 1986). The relative amounts of specific isotypes produced during the antibody response depend on the nature of the antigen. Bacterial protein antigens induce mostly IgG1 and IgG3 in humans. Defensive features of these subclasses include opsonization, binding to C1q and complement activation, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and neutralization. On the other hand, IgG2 subclass predominates in response to polysaccharide antigens, while IgG4 appears to form due to certain antigens that cause allergic reactions (ALBANDAR *et al.*, 2002) or during a chronic stimulation (JEFFERIS e KUMARARATNE, 1990).

Serum levels of IgG1 were higher in CP and GP compared to AP and HC groups. There was no difference between AP and HC perhaps because of the presence of other pathogens. CP and GP serum levels were not significantly different either. This could indicate that IgG1 actually represents a small part of the total IgG pool and there may be an increase of other subclasses. It does not corroborate Graswinckel's findings, which postulate that IgG1 levels are increased in the sera of aggressive and chronic periodontitis patients. Lack of IgG1 response can result in failure to eliminate the infection and to limit the progression of the disease (GEMMEL e SEYMOUR, 2004).

The major subclass response in aggressive periodontitis, according to Graswinckel *et al.* (2004); Tanaka *et al* (2003); Chung *et al.* (2002); Ishihara *et al.* (2001) and Califano *et al.* (1999), is IgG2, although Choi *et al.* (1996) had postulated its function could either be protective or non-protective, depending on the antigen and the type of disease. In the present study, no significant differences in IgG2 levels were found for crude extract of *Pg* ATCC33277 among groups. Fredriksson *et al.* (1999) observed that the levels of total IgG2 were significantly lower in Caucasian periodontitis patients than in the healthy control, and this difference was most pronounced in smokers.

ELISA for IgG4 reacting to crude extract from *Pg* ATCC33277 showed the best results among all the other tests for discriminating the groups. Serum levels of IgG4 reacting to *P. gingivalis* ATCC33277 were higher in chronic periodontitis participants than in all the other groups. It is likely that the concentration of antibody in serum may influence the initiation and progression of periodontal tissue loss (ALBANDAR *et al.*, 2002). IgG4 is formed by the IL-4 and IL-13 stimuli, controlled by Th2 cells. It does not fix complement by binding C1q, but can promote antibody-dependent cellular cytotoxicity and neutralization. Th1 profile predominates in stable lesions, while Th2 profile predominates in advanced and progressive lesions (GEMMEL and SEYMOUR, 2004). Antibody response has been suggested to be generally protective during the chronic phase of the disease. The reduced levels of IgG4 found in the sera of aggressive periodontitis patients compared to chronic periodontitis patients may indicate that humoral immune response can help to decrease the progression of connective tissue breakdown.

Humoral response to fraction IV has been evaluated. There was statistically significant difference among the groups in IgG, IgG2, IgG3, IgG4 and IgA levels. In contrast to crude sonic extract, there was no difference in the presence of IgG1. Data have shown a lower reactivity of IgG to fraction IV in the sera of GP and HC groups. Individuals with either gingivitis or with healthy periodontium rarely harbor *Porphyromonas gingivalis* in subgingival biofilm (SOCRANSKY *et al.*, 1999). Presumably, the environmental factor in healthy sites such as oxide-reduction potential could be adverse to anaerobic bacteria (FRANCA, 2003). CP group had higher levels of IgG, corroborating its role in the disease development.

It seems that serum IgA levels for fraction IV were very similar among groups, except in CP and GP compared to HC. Considering that GP should compose a control group, it should not show elevated levels of IgA. This phenomenon could be attributed to the GP hosts having been exposed to other sources of antigens (cross-reaction, for instance). IgA presence in other biologic fluids, like saliva and gingival crevicular fluid could better explain its role in controlling periodontal infection.

IgG2 and IgG3 levels were different when CP, AP and GP groups were compared to HC group. Similar levels in GP compared with AP and GP groups could be explained by either cross-reaction with other bacterial species, or transitive harboring of *Pg* by GP hosts, without presenting clinical features of the disease.

Serum reactivity of IgG4 allowed a satisfactory assessment of chronic periodontitis patients. Serum levels of IgG4 reacting to *P. gingivalis* ATCC33277 were higher in CP than in all the other groups. Difference between serum levels in CP and AP were statistically insignificant, but a tendency for increased levels in chronic periodontitis remained. This finding is consistent with the concept of Jefferis e Kumararatne (1990) who associate IgG4 production with chronic and prolonged stimuli.

In conclusion, the results of the present study have demonstrated that IgG4 subclass predominates in humoral response to crude sonic extract and fraction IV from *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 of chronic periodontitis patients. The periodontitis serum responses of chronic and aggressive patients can be distinguished from each other by assessing the reaction of IgG4 to crude sonic extract.

REFERENCES:

77. Albandar JM, DeNardin AM, Adesanya MR, Diehl SR, Winn DM. Associations between serum antibody levels to periodontal pathogens and early-onset periodontitis. *J Periodontol* 2001; 72: 1463-69.

78. Albandar JM, DeNardin AM, Adesanya MR, Diehl SR, Winn DM. Associations of serum concentrations of IgG, IgA, IgM and interleukin-1 β with early-onset periodontitis classification and race. **J Clin Periodontol** 2002; 29: 421-426.
79. American Academy of Periodontology. Consensus Report. Chronic Periodontitis. **Ann Periodontol** 1999, 4:53.
80. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. **Electrophoresis**, 1987;8:93–99.
81. Califano JF, Schifferle RE, Gunsolley JC, Best AM, Schekein HÁ, Tew JG. Antibody reactive with *Porphyromonas gingivalis* serotypes K1-6 in adult and generalized early-onset periodontitis. **J Periodontol** 1999; 70: 730-735.
82. Choi J, HÁ M, Kim J, Kim S. Immunoglobulin allotypes and immunoglobulin G subclass responses to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in early-onset periodontitis. **Infection and Immunity**, 1996, 64: 4226-4230.
83. Chung SW, Kang HS, Park HR, Kim SJ, Choi JI. Immune responses to heat shock protein in *P. gingivalis*-infected periodontitis and atherosclerosis patients. **J Periodont Res** 2003; 38: 388-93.
84. Condorelli F, Scalia G, Cali G, Rosseti B, Nicoletti G, Bue AM. Isolation of *Porphyromonas gingivalis* and detection of immunoglobulin A specific to fimbrial antigen in gingival crevicular fluid. **J Clin Microbiol**, 1998; 36:2322-2325.
85. De Nardin AM, Sojar, HT, Grossi SG, Christersson LA, Genco RJ. Humoral immunity of older adults with periodontal disease to *Porphyromonas gingivalis*. **Infection and Immunity**, 1991; 59:4363-4370.
86. Franca MP. Resposta imune humoral em indivíduos com periodontite crônica a antígenos de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277. Brasil. 2003. 94p. Dissertação (Mestrado em Imunologia), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
87. Fredriksson MJ, Figueredo CMS, Gustafsson A, Bergström KG, Asman BE. Effect of periodontitis and smoking on blood leukocytes and acute-phase proteins. **J Periodontol** 1999; 70: 1355-60.
88. Gemmel E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. **Periodontology 2000**, 2004; 35:21-41.
89. Graswinckel J, van der Velden U, van Winkelhoff A, Hoek F, Loos B. Plasma antibody levels in periodontitis patients and controls. **J Clin Periodontol** 2004; 31: 562-568.
90. Hammartröm L, Smith CIE. IgG subclasses in bacterial infections. **Monographs of allergy**, 1986; 19:122-133.
91. Ishihara Y, Zhang J, Fakher M, Best AM, Schenkein HÁ, Barbour SE, Tew JG, Non-redundant roles for interleukin-1 β in regulating human IgG2. **J Periodontol**, 2001; 72:1332-1339.
92. Jefferis R, Kumararatne DS. Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. **Clin and Exp Immunol**, 1990; 80:357-367.
93. Kawashima Y, Ishikawa I. Simple and rapid detection of serum antibody to periodontopathic bacteria by dot blotting. **J Periodont Res** 2002; 37:223-229.
94. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227:680-685.
95. Lopez NJ, Smith PC, Gutierrez J. Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. **J Dent Res**, 2002; 81:58 – 63.
96. Mooney J, Adonogianaki E, Riggio MP, Takahashi K, Haerian A, Kinane DF. Initial serum antibody avidity and success of therapy for chronic periodontitis. **Infection and Immunity**, 1995; 63:3411-3416.

97. O'Brien-Simpson NM, Black CL, Bhogal PS, Cleal SM, Slakeski N, Higgins TJ, Reynolds EC. Serum immunoglobulin G (IgG) and IgG subclass responses to the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complex of *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. **Infection and Immunity**, 2000; 68:2704-2712.
98. Ogawa T, McGhee ML, Moldoveanu Z, Hamada S, Mestecky J, McGhee JR, Kiyono H. Bacteroides-specific IgG and IgA subclass antibody-secreting cells isolated from chronically inflamed gingival tissues. **Clin Exp Immunol**, 1989; 76:103-110.
99. Onoue S, Imai T, Kamuda H, Umemoto T, Kaca W, Isshiki Y, Kaneko A, Kaeahara K. **Microbiol. Immunol**, 2003; 47: 51-55.
100. Pietrzak ER, Polak B, Walsh LJ, Savage NW, Seymour GJ. Characterization of serum antibodies to *Porphyromonas gingivalis* in individuals with and without periodontitis. **Oral Microbiol Immunol** 1998; 13: 65-72.
101. Plombas M, Bernard G, De March AK, Sarda M, Sixou M, Bené Mc, Miller N, Faure G. Isotypic Antibody response to plaque anaerobes in periodontal diseases. **J Periodontol** 2002; 73: 1507-1511.
102. Pussinen PJ, Vilkkuna-Rautrainen T, Alfthan G, Matlila K, Asikainen S. Multiserotype Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as a Diagnostic Aid for periodontitis in Large-Scale Studies. **J Clin Microbiol**, 2002;:512-518.
103. Saito S, Hayakawa M, Hiratsuka K, Takiguchi H, Abiko Y. Complement-mediated killing of *Porphyromonas gingivalis* 381 by immunoglobulin G induced by recombinant 40-kDa outer membrane protein. **Biochemical and Molecular Medicine** 1996; 58: 184-191.
104. Sakai Y, Shimauchi H, Ito H-O, Kitamura M, Okada HI. *Porphyromonas gingivalis*-specific subclasses antibody levels as immunological risk indicators of periodontal bone loss. **J Clin Periodontol** 2001;28:853-859.
105. Socransky SS, Haffajee AD, Ximenez-Fyvie LA, Feres M, Mager D. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. **Periodontology** 2000, 1999; 20:341-362.
106. Tanaka S, Barbour S, Best AM, Schenkein HÁ, Tew JG. Prostaglandin E2-mediated regulation of immunoglobulin G2 via interferon gamma. **J Periodntol** 2003; 74: 771-79.
107. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Nat Acad Sci**, 1979; 76; 4350-4354.
108. Unsal BT, Ozcan G, Balos K, Mevsim G. Serum antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in juvenile periodontitis and adult periodontitis (part I). **J Marmara Univ Dent Fac**, 1996; 2:470-3.
109. Wang P, Oido-Mori M, Fujii T, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, Tanaka J, Azuma Y, Shinihara M, Ohura K. Effect of anti-CD14 antibody on experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. **JPN J Pharmacol** 2002; 89:176-183.
110. Whitney C, Ant J, Moncla B, Johnson B, Page RC, Engel D. Serum immunoglobulin G antibody to *Porphyromonas gingivalis* in rapidly progressive periodontitis: titer, avidity, and subclass distribution. **Infection and Immunity** 1992; 60: 2194-2200.
111. Wittstock M, Flemmig TF, Schmidt H, Mutters R, Karch, H. Serodiagnosis of *Porphyromonas gingivalis* infection by immunoblot analysis with recombinant collagenase. **J Clin Microbiol** 1996;34: 2411-2413.