

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação de Mestrado

**Avaliação clínica, perfil imunológico e microbiota oral de portadores da
síndrome de Papillon-Lefèvre**

Giulia Melo Lettieri

Brasília, 14 de julho de 2021

Giulia Melo Lettieri

**Avaliação clínica, perfil imunológico e microbiota oral de portadores da
síndrome de Papillon-Lefèvre**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Loise Pedrosa Salles

Brasília, 14 de julho de 2021

Giulia Melo Lettieri

**Avaliação clínica, perfil imunológico e Microbiota Oral de portadores da
síndrome de Papillon-Lefèvre**

Dissertação aprovada, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 14/07/2021

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Loise Pedrosa Salles

Prof.^a Dr.^a Ngoc Thanh Thuy Do

Prof.^a Dr.^a Nailê Damé-Teixeira

Dedico este trabalho à minha família, que sempre me apoiou nas horas difíceis, em especial ao meu pai, que me inspirou a seguir esta profissão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Tânia Melo Lettieri, que me ensinou a ser uma mulher forte e determinada, um exemplo e inspiração diária.

Agradeço ao meu pai, Giancarlo Crosara Lettieri, que me ensina todos os dias a ser uma cirurgiã dentista melhor e que me apoiou durante todo este processo.

Agradeço às minhas irmãs, Vittoria Melo Lettieri e Bianca Melo Lettieri, por me amarem e tornarem meus dias mais leves.

Agradeço à minha orientadora, Loise Pedrosa Salles, pela oportunidade de realizar meu trabalho. Obrigada pela confiança e por todos os ensinamentos compartilhados.

Agradeço ao meu coorientador, Laudimar Alves de Oliveira, que me acompanha desde o início da minha carreira na odontologia, guiando-me na graduação e agora na pós-graduação.

Agradeço à professora Nailê Damé-Teixeira, que me acompanhou durante este processo, sempre disponível e pronta para ajudar.

Agradeço a todos os professores e participantes do Projeto Diabetes, que me inspirou a ingressar na pesquisa e no qual eu colhi muitos frutos e amizades. Em especial, aos amigos Camilla Pedrosa, Carlos Alexandre, Rafaella Cristhina, Cecília de Brito, Luander Medrado e Vitor Ramagem.

Agradeço aos amigos que participaram desta jornada comigo. Esses dois anos não seriam os mesmos sem vocês.

A todos que, de alguma forma, contribuíram com este trabalho e apoiaram-me nos momentos difíceis, o meu muito obrigada!

“Aprender é o único antídoto contra a velhice.”

Howard Gardner

RESUMO

A Síndrome de Papillon-Lefèvre (PLS) é uma condição autossômica recessiva rara, que afeta de um a quatro indivíduos por milhão. É caracterizada pela hiperkeratose palmo-plantar, doença periodontal e perda precoce da dentição permanente e decídua, sendo normalmente diagnosticada ainda na infância. A gravidade da doença periodontal em pacientes jovens é o fator determinante para o diagnóstico dessa condição e é atribuído à mutação no gene da Catepsina C, que afeta processos imunes e inflamatórios desses pacientes. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o fenótipo, perfil imunológico a partir do plasma e caracterizar o microbioma salivar de três irmãs portadoras da PLS, bem como a expressão de genes na polpa e ligamento periodontal de uma das irmãs portadoras da síndrome. A metodologia compreendeu, na avaliação das condições clínicas, análise das amostras de polpa dentária e ligamento periodontal por PCR em tempo real (qPCR), exames sanguíneos, avaliação do fluxo salivar, capacidade tampão, concentração da amilase salivar, glicose salivar e caracterização do microbioma usando Next-Generation Sequencing (NGS). As principais características clínicas analisadas nas três pacientes foram perda óssea e perda da dentição permanente; na paciente que permaneceu dentada foi possível notar um quadro grave de periodontite, com inflamação gengival e mobilidade nos dentes remanescentes. Na irmã dentada, alta abundância de *Bacteroidales bacterium* HMT-274, *Fusobacterium*, *Treponema* e *Sulfophobococcus* do domínio *Archaea*. Nas irmãs desdentadas, alta abundância de *Lactobacillus*, *Porphyromonas*, *Streptococcus*, *Haemophilus* e *Caldivirga* do domínio *Archaea*. Existe uma superexpressão de imunoglobulinas e genes alvos nessas pacientes. Pode-se concluir que essa superexpressão e alta imunoglobulina pode explicar a resposta inflamatória exacerbada nesses pacientes, assim como o comprometimento severo dos tecidos periodontais e que existe uma mudança no microbioma desses pacientes após a perda da dentição.

Palavras-chave: Doença de Papillon-Lefèvre; Doença periodontal; Ceratodermia palmar e plantar; Catepsina C.

ABSTRACT

Papillon-Lefèvre Syndrome (PLS) is a rare autosomal recessive condition that affects one to four individuals per million. It is characterized by palmoplantar hyperkeratosis, periodontitis, and early loss of permanent and deciduous dentition, usually diagnosed in childhood. The severity of the periodontitis in young patients is a determining factor for the diagnosis of this condition and is attributed to a mutation in the cathepsin C gene, which affects the immune and inflammatory response of these patients. The aim of the present study was to evaluate the phenotype, immunological profile from the plasma and to characterize the salivary microbiome of three sisters with PLS and the expression of genes in the pulp and periodontal ligament of one of three sisters. The methodology included the evaluation of clinical conditions, analysis of dental pulp and periodontal ligament samples by real-time PCR (qPCR), blood tests, salivary flow, buffering capacity, concentration of salivary amylase, salivary glucose and characterization of the microbiome using Next-Generation Sequencing (NGS). The main clinical characteristics analyzed were bone loss and early loss of permanent dentition. In the patient that remained toothed, it was possible to notice a severe periodontitis, with gingival inflammation and mobility in the remaining teeth. The toothed sister has high abundance of *Bacteroidales bacterium* HMT-274, *Fusobacterium*, *Treponema* e *Sulfophobococcus* of the *Archaea* domain. The edentulous sisters have high abundance of *Lactobacillus*, *Porphyromonas*, *Streptococcus*, *Haemophilus* and *Cladivirga* from the *Archaea* domain. There is an overexpression of immunoglobulins and target genes in these patients. It can be concluded that this overexpression and high immunoglobulin may explain the exacerbated inflammatory response and the severe involvement of the periodontal tissues in these patients, and that there is a microbiome change of these patients after the dentition loss.

Keywords: Papillon-Lefèvre disease; Periodontal Disease; Keratoderma, Palmoplantar; Cathepsin C.

LISTA DE FIGURAS

Figura A - Pé com características de hiperkeratose plantar PLS1	33
Figura B - Mãos com características de hiperkeratose palmar PLS1.....	33
Figura C - Lesões faciais de pele PLS1	34
Figura D - Radiografia panorâmica da paciente PLS1 com perda prematura da dentição permanente e grande perda óssea	34
Figura E - Imagens intraorais paciente PLS1 com visível perda prematura da dentiçã permanente e gengiva hiperplasiada.....	35
Figura F - Radiografia panorâmica da paciente PLS2 com perda prematura da dentição permanente e grande perda óssea	35
Figura G - Imagens intraorais paciente PLS2 com visível perda prematura da dentiçã permanente e gengiva hiperplasiada.....	36
Figura H - Radiografia panorâmica da paciente PLS3 com perda prematura da dentição permanente e grande perda óssea	36
Figura I - Imagens intraorais paciente PLS3 com visível perda prematura da dentiçã permanente e gengiva hiperplasiada.....	37
Figura 1 – Fotos intraoral da paciente PLST (paciente dentada). As setas indicam bolsas periodontais. É possível perceber uma perda significativa de dentes. Figura 1A: foto oclusal. Figura 1B: foto do arco superior. Figura 1C: foto do arco inferior. 59	
Figura 2 – Panorâmica da paciente PLST (paciente dentada), mostrando perda óssea e aparência “flutuante” dos dentes.	59
Figura 3 – Distribuição do filo no microbioma salivar nas irmãs com Síndrome de Papillon-Lefèvre.....	62
Figura 4 – Heatmap comparando gêneros nos três grupos. Papillon-Lefèvre dentada (PLST), Papillon-Lefèvre desdentada 1 (PLSTL1), Papillon-Lefèvre desdentada 2 (PLSTL2).	63
Figura 5 – Diagrama de Venn mostrando os gêneros da microbiota compartilhada na Síndrome de Papillon-Lefèvre, na paciente dentada (PLST) e nas irmãs desdentadas (PLSTL1 e PLSTL2). [...].	64
Figura 6 – Biogeografia de microbioma subgengival hipotética de PLST. Os dentes recém erupcionados servem como suporte de fixação para comensais onipresentes que formam uma película inicial (<i>Streptococcus</i> e <i>Actinomyces</i>). [...].	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Fold de expressão da IL-3 em polpa por qPCR. Grupo controle (CT1) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.....	38
Gráfico 2 – Fold de expressão da IL-3 em polpa por qPCR. Grupo controle (CT2) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.....	39
Gráfico 3 – Fold de expressão da IL-3 em Ligamento Periodontal por qPCR. Grupo controle (CT1) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.....	39
Gráfico 4 – Fold de expressão do IL-3 em ligamento periodontal por qPCR. Grupo controle (CT2) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.....	40
Gráfico 5 – Fold de expressão do TNF-alfa em polpa por qPCR. Grupo controle (CT1) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.....	40
Gráfico 6 – Fold de expressão do TNF-alfa em polpa por qPCR. Grupo controle (CT2) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.....	41
Gráfico 7 – Fold de expressão de TNF-alfa em Ligamento Periodontal por qPCR. Grupo controle(CT1) e paciente com a síndrome(PLS). Média e Desvio Padrão.....	41
Gráfico 8 - Fold de expressão do TNF-alfa em Ligamento periodontal por qPCR. Grupo controle (CT2) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão ..	42
Gráfico 9 - Fold de expressão do CAPN1 em polpa por qPCR. Grupo controle (CT1) e paciente com a síndrome (PLS). Média e desvio Padrão.....	42
Gráfico 10 - Fold de expressão do CAPN1 em polpa por qPCR. Grupo controle (CT2) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.....	43
Gráfico 11 - Fold de expressão do VIM em Ligamento periodontal por qPCR. Grupo controle (CT1) e paciente com a síndrome (PLS). Média e desvio Padrão.....	43
Gráfico 12 - Fold de expressão do VIM em Ligamento periodontal por qPCR. Grupo controle (CT2) e paciente com a síndrome (PLS). Média e desvio Padrão.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos indivíduos PLS e parâmetros salivares, pH, capacidade tampão, fiabilidade, fluxo salivar, atividade da amilase e glicose na síndrome de Papillon-Lefèvre.....	60
--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1.1 INTRODUÇÃO	13
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	14
1.2.1 Fenótipo da Síndrome de Papillon-Lefèvre	20
1.2.2 A catepsina C ou dipeptidil-peptidase I	20
1.2.3 O comprometimento do sistema imunológico na PLS	20
1.2.4 Microbioma na Síndrome de Papillon-Lefèvre	20
1.3 OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO	20
1.3.1 Objetivo primário	20
1.3.2 Objetivos secundários	20
1.4 REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2 – EXPRESSÃO GÊNICA DE IL-3, TNF- α, CAPN1 E VIM EM PORTADORES DA SÍNDROME DE PAPIILLON-LEFÈVRE	27
RESUMO	27
2.1 INTRODUÇÃO	29
2.2 METODOLOGIA	30
2.3 RESULTADOS	32
2.4 DISCUSSÃO	46
2.5 CONCLUSÃO	46
2.6 REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO 3 – FENÓTIPO ORAL E MICROBIOMA SALIVAR DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME DE PAPIILLON-LEFÈVRE	51
RESUMO	51
3.1 INTRODUÇÃO	53
3.2 METODOLOGIA	55
3.2.1 Seleção de pacientes, avaliação clínica e radiográfica	55
3.2.2 Características salivares	56
3.2.2.1. Fluxo e fiabilidade salivar	56
3.2.2.2 pH Salivar e Capacidade Tampão	56
3.2.2.3 Glicose salivar	56
3.2.2.4. Amilase Salivar	57
3.2.3. Extração de DNA salivar, Sequenciamento de Amplicon e Bioinformática	57
3.3 RESULTADOS	58
3.3.1 Fenótipo oral	58
3.3.2 Características salivares	59
3.3.3 Microbioma salivar	60

3.4 DISCUSSÃO	64
3.5 CONCLUSÕES	71
3.6 REFERÊNCIAS.....	72
CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO	78
4.1 DISCUSSÃO GERAL.....	78
4.2 CONCLUSÕES.....	80
4.3 REFERÊNCIAS.....	81
CAPÍTULO 5 – <i>PRESS RELEASE</i>	84
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	86

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Papillon-Lefèvre (PLS) é um raro distúrbio hereditário autossômico recessivo [1-3]. Está vinculada a filhos de casamentos consanguíneos, cujos pais possuem a presença da mesma mutação em heterozigoto [3-6]. É caracterizada pela hiperkeratose palmo-plantar, perda precoce da dentição decídua e perda precoce da dentição permanente devido a um quadro agressivo de doença periodontal [7,8], podendo chegar a quadros de edentulismo [4].

A doença periodontal nesses indivíduos gera um significativo comprometimento das estruturas de suporte dentárias. O periodonto, tanto na dentição decídua quanto na permanente, é severamente acometido por infecção de evolução rápida que, em diversos casos, leva a perda precoce de toda a dentição. A gengiva aparece hemorrágica e hiperplásica com perda óssea e dentária [8]. O tratamento da doença periodontal, nesses casos, é muitas vezes difícil e não satisfatório com terapia convencional [6,9].

Os portadores da síndrome possuem uma mutação no gene da Catepsina C (CTSC), localizado no cromossomo 11q14, que inativa ou reduz sua função [10,11]. Essa mutação afeta processos imunes e inflamatórios que ainda não foram bem descritos, mas que possivelmente justificam a agressividade da doença periodontal na síndrome. Por esse fato, a avaliação do perfil imunológico desses pacientes é de extrema importância para que sejam adotadas medidas preventivas que possam reduzir os efeitos observados clinicamente.

Uma microbiota em disbiose deve ser um fator a ser considerado quando se avalia uma doença periodontal agressiva. Caracterizar a microbiota encontrada nos pacientes sindrômicos pode auxiliar no entendimento da relação entre doença periodontal agressiva, disfunção imunológica e inflamatória e como essa microbiota do hospedeiro pode influenciar na doença.

Essa pesquisa foi aceita pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília (FS-UnB; no. 99311218.0.0000.0030). Os indivíduos e seus responsáveis foram informados verbalmente sobre o objetivo do estudo e assinaram o termo de consentimento.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil imunológico, a expressão gênica e caracterizar a microbiota de três irmãs portadoras da síndrome de Papillon-Lefèvre, em conjunto com as condições clínicas identificadas.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1. Fenótipo da síndrome de Papillon-Lefèvre

A síndrome de Papillon-Lefèvre foi primeiramente descrita em 1924 por Papillon e Lefèvre [12] como “Mal de Meleda” e só em 1956 foi descrita como uma condição separada por Dekker e Jansen (1956) [13]. É uma condição rara, que afeta de 1 a 4 indivíduos por milhão [14], autossômica recessiva, e na maioria dos casos a agregação familiar é observada através da consanguinidade parental [3-6]. Seus primeiros sintomas aparecem entre 1 e 4 anos de idade e não há predileção racial ou sexual predominante [14,15].

Seu fenótipo é caracterizado pela hiperkeratose palmo-plantar, sendo a perda precoce da dentição decídua e permanente devido à doença periodontal a característica clínica chave dessa condição [7,8]. Observa-se um quadro agressivo de doença periodontal e significativo comprometimento do periodonto, gerando uma grande perda óssea, gengiva inflamada e a sensação de dentes “flutuando” no exame radiográfico, devido à perda do tecido de suporte. É observada uma piora na doença periodontal nos períodos de erupção dentária, a primeira por volta dos 3 anos de idade e a segunda por volta dos 15 anos de idade [11, 16, 17]. A causa dessa doença periodontal tão agressiva ainda não foi bem explicada, mas tem sido atribuída a um defeito no neutrófilo, que causa uma diminuição da fagocitose e quimiotaxia [18]. Outros sinais menos frequentes são calcificação intracranial, maior susceptibilidade de infecções bacterianas, deficiência intelectual, hiperkeratose folicular e onicogribose [4,19].

As características hiperkeratóticas geralmente não são graves nesses pacientes, e o tipo difuso é mais comum do que o tipo pontuado em sua maioria [20]. Algumas lesões semelhantes à psoríase também podem se desenvolver, principalmente nos cotovelos, joelhos e dedos [11]. Também são observadas infecções cutâneas leves recorrentes e que geram pus [21,22]. Entre 20% a 25% dos pacientes aparentam ter uma susceptibilidade aumentada a infecções, como

furunculose, pioderma e abscessos hepáticos piogênicos, entre outras complicações [3, 23].

O aumento na incidência de infecções nos portadores da síndrome levou à hipótese de que existe um distúrbio imunológico subjacente [19]. Pesquisas indicam que um déficit imunológico nessa condição ocorre como resultado da mutação do gene da catepsina C (*CTSC*), localizada no cromossomo 11q14-21 [11, 19, 24]. Mutações no gene da catepsina C parecem estar associadas à síndrome de Papillon-Lefèvre (PLS), à síndrome de Haim-Munk (HMS) e à Periodontite Pré-puberal (PPP), nas quais a condição comum em todas é uma agressiva doença periodontal, que sugere que outros fatores, genéticos ou ambientais, possuem um papel determinante no fenótipo final, diferenciando essas condições [19, 24, 25]. Esses pacientes, no entanto, não possuem imunodeficiência sistêmica de forma acentuada, apesar da ausência quase que total de serina protease, segundo Pham, 2004 [26].

Mutações no gene da catepsina C foram reconhecidos como causa da PLS desde o final dos anos 1990, e mais de 75 mutações foram identificadas [20, 27]. A maioria das mutações foram descritas em casos de PLS (97%), enquanto algumas mutações foram descritas na HMS e em casos de periodontite (3%) [20]. Uma expressão variável do fenótipo da mesma mutação gera uma reflexão sobre a influência de outros fatores genéticos e/ ou ambientais. Segundo Nagy et al. (2014) [20], as mutações da *CTSC* são divididas da seguinte forma: missense (53%), nonsense (23%) e frameshift (17%); mas uma variante de splicing e uma mutação da região 5' não traduzida também foram relatadas. A maioria das mutações estão localizadas nos exons 5-7 [20].

1.2.2. A catepsina C ou dipeptidil-peptidase I

A *CTSC* codifica a proteína Catepsina C, também conhecida como dipeptidil-peptidase I, é uma exo-cisteína proteinase lisossomal e pertence à família da peptidase C1 [28]. Ela é capaz de remover dipeptídeos do terminal amino de substratos de proteínas e que são expressas em células efetoras derivadas da medula óssea das séries mieloide e linfóide [11,28], as quais estão relacionados a uma ampla variedade de processos inflamatórios e imunológicos, incluindo citotoxicidade, destruição fagocítica de bactérias, ativação local de citocinas e outros mediadores inflamatórios e degradação da matriz extracelular [25,29].

Além disso está envolvida na ativação zimogênica de serina proteases, como elastase, catepsina G, proteinase 3 [30] , que possuem uma importante função na

diferenciação epitelial e descamação [11] e na degradação intracelular de proteínas [31]. É expressa em diversos tecidos do corpo, como epitélio da palma das mãos, sola dos pés, joelhos, cotovelos e gengiva queratinizada; em células imunes, células NK, leucócitos polimorfonucleares, linfócitos T, macrófagos, fibroblastos e osteoclastos [24, 25, 29-32]. A CTSC pode influenciar também na progressão da doença periodontal por meio de seu papel na diferenciação epitelial/ descamação, pois uma alteração no epitélio sucular e juncional pode alterar a barreira mecânica dos patógenos periodontais [11]. Por esses motivos, ela aparenta ser um bom alvo terapêutico para doenças crônicas inflamatórias e auto-imunes [30].

Até o momento, a função mais bem descrita da catepsina C é a de ativar diferentes serinas proteases derivadas de células imunes, porém a lista dos seus alvos ainda não foi bem descrita na literatura e vários questionamentos ainda precisam ser investigados, como sua função nos tecidos periféricos e sua regulação fisiológica, para que se tenha um melhor entendimento biológico desta protease [30]. Entender melhor a função da catepsina C e sua inibição, pode fornecer meios terapêuticos para combater doenças inflamatórias. A alteração na atividade da catepsina C, como pode ser observada em PLS, não compromete a sobrevivência destes pacientes, embora tenha consequências fisiopatológicas [30].

Em ensaios pré-clínicos, a inibição farmacológica prolongada da CTSC da medula óssea, resulta na inibição e eliminação de proteases semelhantes à elastase em neutrófilos do sangue, resultado semelhante com o que acontece na PLS [33]. Dessa maneira, imitar, através da inibição farmacológica, a deficiência genética em neutrófilos da PLS, parece ser uma estratégia atraente para estudar doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes causadas por neutrófilos [30].

1.2.3. O comprometimento do sistema imunológico na síndrome de Papillon Lefèvre

A perda da atividade da CTSC causa uma subsequente perda na atividade da serina protease de neutrófilos, que resulta na redução da capacidade dos neutrófilos de quimiotaxia de maneira eficiente e incapacidade de gerar as armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs) [32,34]. Os neutrófilos polimorfonucleares possuem um papel importante na defesa do hospedeiro quanto a patógenos, pois elaboram proteases que possuem envolvimento na imunidade do hospedeiro e possuem capacidade bactericida [35, 36]. Entretanto, as enzimas liberadas por esses

neutrófilos também degradam os componentes da matriz celular, o que gera danos nos tecidos e inflamação crônica [35, 37]. Acredita-se que essa perda da atividade da serina protease dos neutrófilos em eliminar as bactérias periodontais seja a causa subjacente da gravidade da doença nesses pacientes, os neutrófilos erradicam os patógenos através da fagocitose como parte vital da imunidade inata e adquirida [32].

De acordo com Sorensen (2014) [38], a falha da eliminação de bactérias provavelmente estimula um recrutamento mal direcionado de neutrófilos hiper-responsivos para os tecidos periodontais, o que parece fornecer uma explicação para a inflamação grave e perda óssea nesses pacientes na doença periodontal. Esse defeito aparece localizado em áreas do corpo suscetíveis a um desafio bacteriano direto e crônico, como ocorre na doença periodontal e em alguns abscessos cutâneos, justificando, dessa maneira, a não presença de infecções sistêmicas nesses pacientes [32].

A destruição óssea que ocorre na doença periodontal é resultado de mediadores que induzem a formação e ativação de osteoclastos na inflamação [39]. A reabsorção óssea é modulada por citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , que são reguladas positivamente frente a resposta de uma infecção bacteriana em equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, que controlam e extensão da resposta imune do hospedeiro à estimulação durante um processo inflamatório crônico [39]. Dessa maneira, o controle dos mecanismos pró-inflamatórios é essencial para evitar a destruição excessiva do tecido.

Porém, foram relatados níveis elevados de liberação de citocinas pró-inflamatórias por neutrófilos do sangue periférico em pacientes com PLS, tanto na presença ou na ausência de estímulos bacterianos [15,18, 30]. Outras proteínas regulatórias do sistema imune, que são biomarcadores da ativação de neutrófilos, também foram relatadas estarem em alto níveis em neutrófilos de pacientes PLS [40].

Foi observado em pacientes PLS uma quimiotaxia defeituosa nos neutrófilos [15], sendo uma consequência disso uma movimentação ineficiente de neutrófilos em tecidos infectados [30]. Em outro artigo também foi observado que os fibroblastos dos pacientes portadores de PLS possuem baixa taxa de crescimento e morfologia anormal, uma diminuição na capacidade respiratória quando comparado a uma célula controle e uma autofagia defeituosa [3].Recentemente, um fenótipo de imunodeficiência de células T foi descrito em pacientes PLS, e como as células T e B tem a mesma origem, esse resultado pode sugerir que as células plasmáticas podem

estar envolvidas também nas bases moleculares de PLS e pode envolver outros modelos celulares [40].

1.2.4. Microbioma na síndrome de Papillon Lefèvre

A Doença Periodontal (PD) é um exemplo de sucessão microbiana e interação hospedeiro-bactéria. A sua colonização inicialmente envolve membros do complexo amarelo, verde e roxo, que sucedem com o complexo laranja e vermelho, que se manifesta como gengivite e quase todas as espécies do complexo laranja e vermelho se encontram em elevados índices em indivíduos com PD [42]. De acordo com Socransky et al. (2005) [41], as espécies mais prevalentes de biofilme subgengival na doença periodontal crônica são *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Veillonella paryula*, *T. forsythia* e *Prevotella melaninogenica*. A etiologia da periodontite é complexa e há muitos microrganismos envolvidos. Existem ainda várias espécies não cultivadas que não foram identificadas ainda que podem influenciar a doença combinada com a suscetibilidade do hospedeiro [42].

A patogênese da periodontite na PLS ainda não é muito bem descrita, e pouco se sabe em relação a rápida progressão da doença nesses pacientes [1]. Devido ao um gap de conhecimento sobre o assunto, o tratamento para PD nesses casos é bem desafiador. Existem alguns estudos que investigam os perfis microbiológicos da PLS e em sua maioria foram utilizadas técnicas de cultura microbiológica para identificar bactérias [1, 43, 44]. Nesses estudos foram identificados na placa subgengival de pacientes PLS *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra* e outras espécies [44-46].

A avaliação realizada por Albandar et al. 2012 [1] no estudo do microbioma supra e subgengival da PLS mostra que existe uma grande diversidade de microorganismos nesses pacientes e que é dominado por espécies que já foram associados a formas agressivas e crônicas de doença periodontal. O estudo de Colombo et al. 2009 [47], onde a metodologia foi semelhante à descrita por Albandar et al. 2012 [1], concorda com esses achados, onde relatou uma maior frequência de espécies ligadas a DP refratária em bolsas subgengivais quando comparados a pacientes saudáveis ou pacientes com PD mas que o tratamento foi bem-sucedido. As espécies bacterianas frequentemente encontradas em ambos estudos foram: *T. forsythia*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* ssp., *Treponema* spp., *Campylobacter*, e *P. micra*; e são consideradas clássicas para DP [1, 47].

A presença em grande frequência de *Gemella*, *Streptococcus* e *Veillonella* em pacientes imunocomprometidos [48] e em pacientes com PLS pode justificar o papel de infecções oportunistas na patogênese da periodontite nos pacientes PLS [1,]. Além disso, a presença de *A. actinomycetemcomitans* pode ser um importante fator etiológico na iniciação da PD, devido a alta produção de leucotoxina [49], porém a presença apenas dele não justifica a agressividade da PD na PLS [46]. Isso sugere, que além dos microorganismos já bem descritos na literatura que estão relacionados a DP, outras espécies podem estar envolvidas no desenvolvimento da PD nos pacientes PLS [1].

Albandar et al. 2012 [1] e outros trabalhos utilizaram o método clonagem para realização do trabalho, através do 16S rRNA. Esse método já foi bastante utilizado, porém, leva a perda de diversidade, principalmente em microorganismos não cultivados e aumenta a chance de contaminação da amostra [50]. A metodologia utilizada nesta pesquisa foi o método Next Generation Sequency (NGS), uma metodologia mais moderna, a partir da qual conseguimos identificar uma maior diversidade de microorganismos, inclusive não-cultiváveis. Dessa maneira pudemos descrever outros microorganismos, por exemplo, do reino *Archaea*.

Para o sucesso do tratamento da doença periodontal na PLS e melhor entendimento dessa condição, é necessário o conhecimento e compreensão da tríade: microbiota oral, resposta imune e inflamatória e mutação da catepsina C para que novos tratamentos possam ser desenvolvidos e para que esses pacientes possam ter qualidade de vida.

1.3 OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

1.3.1 Objetivo primário

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar e analisar a microbiota salivar, perfil imunológico e clínico com ênfase nas condições bucais dos portadores da síndrome de Papillon-Lefèvre.

1.3.2 Objetivos secundários

- Caracterizar a composição da microbiota salivar através de *Next Generation Sequency* (NGS) dos portadores da síndrome de Papillon-Lefèvre;
- Analisar o perfil imunológico dos portadores da síndrome de Papillon-Lefèvre;
- Analisar a presença de doença periodontal e a gravidade em portadores da síndrome de Papillon-Lefèvre.
- Analisar parâmetros salivares de portadores da síndrome de Papillon-Lefèvre;
- Avaliar por real-time PCR (qPCR) a expressão dos genes Interleucina 3 (*IL-3*), Fator de Necrose Tumoral alfa (*TNF- α*), Calpain-1 (*CAPN1*) e Vimentin (*VIM*) em amostras da polpa dentária de dentes indicados para exodontia pela própria condição clínica da Síndrome Papillon-Lefèvre e de um terceiro molar e um pré-molar de pacientes saudáveis indicados para exodontia por motivo ortodôntico (grupo controle, CT).

1.4 REFERÊNCIAS

1. Albandar JM, Khattab R, Monem F, Barbuto SM, Paster BJ. The subgingival microbiota of Papillon-Lefèvre syndrome. *Journal of periodontology*. 2012;83(7):902-8.
2. Bhavsar MV, Brahmabhatt NA, Sahayata VN, Bhavsar NV. Papillon-lefevre syndrome: Case series and review of literature. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2013;17(6):806.
3. Bullón P, Castejón-Vega B, Román-Malo L, Jimenez-Guerrero MP, Cotán D, Forbes-Hernandez TY, et al. Autophagic dysfunction in patients with Papillon-Lefevre

syndrome is restored by recombinant cathepsin C treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018;142(4):1131-43. e7.

4. AlBarrak ZM, Alqarni AS, Chalisserry EP, Anil S. Papillon–Lefèvre syndrome: a series of five cases among siblings. *Journal of medical case reports*. 2016;10(1):260.
5. Patel S, Davidson L. Papillon–Lefèvre syndrome: a report of two cases. *International journal of paediatric dentistry*. 2004;14(4):288-94.
6. Soliman H, Eldeen HG, Mustafa MI. A novel nonsense mutation in cathepsin C gene in an Egyptian patient presenting with Papillon–Lefèvre syndrome. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2015;16(4):387-92.
7. Jordan RC. Diagnosis of periodontal manifestations of systemic diseases. *Periodontology 2000*. 2004;34(1):217-29.
8. Tumen DS, Tumen EC, Gunay A, Lacin N, Cetin SG. The typical appearance and CBCT images of the patient with papillon-lefevre syndrome: a case report. *Journal of International Dental and Medical Research*. 2015;8(3):128.
9. Sadik CD, Noack B, Schacher B, Pfeilschifter J, Mühl H, Eickholz P. Cytokine production by leukocytes of Papillon–Lefèvre syndrome patients in whole blood cultures. *Clinical oral investigations*. 2012;16(2):591-7.
10. Fischer J, Blanchet-Bardon C, Prud'homme J-F, Pavsek S, Steijlen PM, Dubertret L, et al. Mapping of Papillon-Lefevre syndrome to the chromosome 11q14 region. *European Journal of Human Genetics*. 1997;5:156-60.
11. Toomes C, James J, Wood AJ, Wu CL, McCormick D, Lench N, et al. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nature genetics*. 1999;23(4):421-4.
12. Papillon M, Lefevre P. Two cases of symmetrically familial palmar and plantar hyperkeratosis (Meleda disease) within brother and sister combined with severe dental alterations in both cases. *Bull Soc Fr Dermatol Syphiligr*. 1924;31(2):82-7.
13. Jansen L, Dekker G. Hyperkeratosis palmo-plantaris with periodontosis (Papillon-Lefèvre). *Dermatology*. 1956;113(4):207-19.

14. Hart TC, Shapira L. Papillon-Lefèvre syndrome. *Periodontology* 2000. 1994;6(1):88-100.
15. Roberts H, White P, Dias I, McKaig S, Veeramachaneni R, Thakker N, et al. Characterization of neutrophil function in Papillon-Lefèvre syndrome. *Journal of leukocyte biology*. 2016;100(2):433-44.
16. Fardal O, Drangsholt E, Olsen I. Palmar plantar keratosis and unusual periodontal findings. Observations from a family of 4 members. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):181-4.
17. Lundgren T, Renvert S. Periodontal treatment of patients with Papillon-Lefèvre syndrome: a 3-year follow-up. *J Clin Periodontol*. 2004 Nov;31(11):933-8.
18. Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacological reviews*. 2010;62(4):726-59.
19. Hart TC, Hart PS, Bowden DW, Michalec MD, Callison SA, Walker SJ, et al. Mutations of the cathepsin C gene are responsible for Papillon-Lefevre syndrome. *Journal of medical genetics*. 1999;36(12):881-7.
20. Nagy, N., Vályi, P., Csoma, Z., Sulák, A., Tripolszki, K., Farkas, K., Paschali, E., Papp, F., Tóth, L., Fábos, B., Kemény, L., Nagy, K., & Széll, M. CTSC and Papillon-Lefèvre syndrome: detection of recurrent mutations in Hungarian patients, a review of published variants and database update. *Molecular genetics & genomic medicine*. 2014; 2(3), 217–228.
21. Gorlin RJ, Sedano H, Anderson VE. The Syndrome Of Palmar-Plantar Hyperkeratosis And Premature Periodontal Destruction Of The Teeth. A Clinical And Genetic Analysis Of The Papillon-Lefevre Syndrome. *J Pediatr*. 1964 Dec;65:895-908.
22. Haneke E. The Papillon-Lefèvre syndrome: keratosis palmoplantaris with periodontopathy. Report of a case and review of the cases in the literature. *Hum Genet*. 1979 Sep 2;51(1):1-35.
23. Bullón P, Morillo JM, Thakker N, Veeramachaneni R, Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, et al. Confirmation of oxidative stress and fatty acid disturbances in two further Papillon-Lefèvre syndrome families with identification of a new mutation. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014;28:1049-56.
24. Hart P, Zhang Y, Firatli E, Uygur C, Lotfazar M, Michalec M, et al. Identification of cathepsin C mutations in ethnically diverse Papillon-Lefèvre syndrome patients. *Journal of medical genetics*. 2000;37(12):927-32.

25. Hewitt C, McCormick D, Linden G, Turk D, Stern I, Wallace I, et al. The role of cathepsin C in Papillon-Lefevre syndrome, prepubertal periodontitis, and aggressive periodontitis. *Human mutation*. 2004;23(3):222-8.
26. Pham CT, Ivanovich JL, Raptis SZ, Zehnbauser B, Ley TJ. Papillon-Lefèvre syndrome: correlating the molecular, cellular, and clinical consequences of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I deficiency in humans. *J Immunol*. 2004 Dec 15;173(12):7277-81.
27. Alkhiary, Y. M., Jelani, M., Almramhi, M. M., Mohamoud, H. S. A., Al-Rehaili, R., Al-Zahrani, H. S., ... & Al-Aama, J. Y. Whole-exome sequencing reveals a recurrent mutation in the cathepsin C gene that causes Papillon-Lefevre syndrome in a Saudi family. *Saudi journal of biological sciences*. 2016. 23(5), 571-576.
28. Pham CT, Ley TJ. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(15):8627-32.
29. Cury VF, Costa JE, Gomez RS, Boson WL, Loures CG, De ML. A novel mutation of the cathepsin C gene in Papillon-Lefevre syndrome. *J Periodontol*. 2002. 73:307–312
30. Korkmaz B, Caughey GH, Chapple I, Gauthier F, Hirschfeld J, Jenne DE, Ketritz R, Lalmanach G, Lamort AS, Lauritzen C, Łęgowska M, Lesner A, Marchand-Adam S, McKaig SJ, Moss C, Pedersen J, Roberts H, Schreiber A, Seren S, Thakker NS. Therapeutic targeting of cathepsin C: from pathophysiology to treatment. *Pharmacol Ther*. 2018 Oct;190:202-236.
31. Rao NV, Rao GV, Hoidal JR. Human dipeptidyl-peptidase I. Gene characterization, localization, and expression. *J Biol Chem*. 1997. Apr. 11;272(15):10260-5.
32. Sørensen OE, Clemmensen SN, Dahl SL, Østergaard O, Heegaard NH, Glenthøj A, et al. Papillon-Lefevre syndrome patient reveals species-dependent requirements for neutrophil defenses. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(10):4539-48.
33. Wolters, P.J., Raymond, W.W., Blount, J.L., & Caughey, G.H. Regulated expression, processing, and secretion of dog mast cell dipeptidyl peptidase I. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998. 273, 15514–15520.
34. De Haar SF, Tigchelaar-Gutter W, Everts V, Beertsen W. Structure of the periodontium in cathepsin C-deficient mice. *European journal of oral sciences*. 2006;114(2):171-3.
35. Adkison AM, Raptis SZ, Kelley DG, Pham CT. Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. *J Clin Invest*. 2002 Feb;109(3):363-71.

36. Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood*. 1990 Dec 1;76(11):2169-81.
37. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*. 1989 Feb 9;320(6):365-76.
38. Dessauane Neto N, Porpino MTM, Antunes HS, Rodrigues RCV, Perez AR, Pires FR, et al. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine expression in post-treatment apical periodontitis. *Journal of Applied Oral Science*. 2018; 26:e20170455
39. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*. 2007 Jan;81(1):28-37
40. Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell* 2016;3:588-96.
41. Socransky SS, Haffajee. Periodontal Microbial Ecology. *Periodontology* 2000. 2005. (38): 135-187.
42. Kumar P, Griffen A, Barton J, Paster B, Moeschberger M, Leys E. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *Journal of dental research*. 2003. 82(5): 338-344.
43. Newman M, Angel I, Karge H, Weiner M, Grinenko V, Schusterman L. Bacterial studies of the Papillon-Lefèvre syndrome. *J Dent Res*. 1977 May;56(5):545
44. Robertson KL, Drucker DB, James J, Blinkhorn AS, Hamlet S, Bird PS. A microbiological study of Papillon-Lefèvre syndrome in two patients. *J Clin Pathol* 2001; 54:371-376.
45. Lundgren T, Renvert S, Papapanou PN, Dahlén G. Subgingival microbial profile of Papillon-Lefèvre patients assessed by DNA-probes. *J Clin Periodontol*. 1998 Aug;25(8):624-9.
46. Velazco CH, Coelho C, Salazar F, Contreras A, Slots J, Pacheco JJ. Microbiological features of Papillon-Lefèvre syndrome periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999;26: 622-627.
47. Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Van Dyke TE, Dewhirst F, Paster BJ. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol*. 2009 Sep;80(9):1421-32.
48. Aas JA, Barbutto SM, Alpagot T, Olsen I, Dewhirst FE, Paster BJ. Subgingival plaque microbiota in HIV positive patients. *J Clin Periodontol* 2007;34:189-195.

49. Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: A prospective longitudinal cohort study. *Lancet* 2008;371: 237-242.
50. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Apr;24(4):335-341.

CAPÍTULO 2

EXPRESSÃO GÊNICA DE *IL-3*, *TNF- α*, *CAPN1* e *VIM* EM PORTADORES DA SÍNDROME DE PAPILLON-LEFÈVRE

ESTUDO PILOTO QUE GEROU UM CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO
COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA E TÉCNICA EM ODONTOLOGIA 5 - ISBN: 978-85-
7247-962-2 DOI: 10.22533/at.ed.622202401

CAPÍTULO 2 – EXPRESSÃO GÊNICA DE *IL-3*, *TNF- α* , *CAPN1* E *VIM* EM PORTADORES DA SÍNDROME DE PAPILLON-LEFÈVRE¹

RESUMO

A síndrome de Papillon-Lefèvre (PLS) é uma condição rara que afeta um a cada quatro indivíduos por milhão. Normalmente, é identificada ainda na infância, durante a dentição decídua, devido à perda precoce de dentes, doença periodontal grave e hiperqueratose palmo-plantar. Atribui-se à mutação no gene da catepsina C, que afeta os processos imunes e inflamatórios nos portadores da síndrome, o grave quadro periodontal. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o fenótipo, o perfil imunológico no plasma sanguíneo de três irmãs portadoras da PLS e a expressão de genes, possivelmente relacionados à periodontite, no ligamento periodontal e polpa dentária de uma das irmãs portadoras da PLS. A metodologia compreendeu a avaliação das condições clínicas, análises das amostras de polpa dentária e ligamento periodontal por PCR em tempo real (qPCR) e exames sanguíneos. O qPCR revelou alta expressão de *IL-3* e *TNF- α* em polpa e ligamento periodontal do paciente PLS, quando comparados a amostra controle não síndrômica, alta expressão de *VIM* no ligamento periodontal do paciente PLS e valores similares para *CAPN1* em polpa entre o paciente síndrômico e o não síndrômico. Portanto, pode-se concluir que as imunoglobulinas e os genes alvos estavam superexpressos no paciente PLS, o que pode explicar a resposta inflamatória exacerbada nesses pacientes e o comprometimento estrutural severo dos tecidos periodontais.

Palavras-chave: Doença de Papillon-Lefèvre; Doença periodontal; Ceratodermia palmar e plantar; Catepsina C.

¹ Artigo baseado em normas do livro *Comunicação Científica e Técnica em Odontologia 5*.

ABSTRACT

Papillon-Lefèvre syndrome (PLS) is a rare condition that affects one to four individuals per million. It is usually identified during childhood during deciduous dentition due to premature tooth loss, severe periodontal disease, and palmoplantar keratoderma. The severe periodontal disease in patients with the syndrome is attributed to the mutation in the cathepsin C gene, which affects their immune and inflammatory processes. The aim of this study was to evaluate the phenotype, the blood plasma immunological profile of the three sisters with PLS and the expression of genes possibly related to the periodontitis in the periodontal ligament and dental pulp of one of the three sisters. The methodology comprised: Assessment of their clinical conditions, real-time PCR analysis (qPCR) of the dental pulp and periodontal ligament and blood tests. The qPCR of pulp and periodontal ligament tissues revealed a high expression of *IL-3* and *TNF- α* in the PLS patient when compared to the non-syndromic controls, high expression of *VIM* in periodontal ligament tissues of PLS patient and similar values of *CAPN1* in pulp of both groups. Therefore, we can conclude that the immunoglobulins and the target genes were over expressed in PLS, which may explain the exacerbated inflammatory response in these patients and the severe structural impairment of the periodontal tissues.

Keywords: Papillon-Lefèvre disease; Periodontal disease; Keratoderma, palmoplantar; Cathepsin C

2.1 INTRODUÇÃO

A síndrome de Papillon-Lefèvre (PLS) é uma condição hereditária autossômica recessiva [1, 2]. Caracteriza-se pela perda precoce das dentições decídua e permanente decorrente de um quadro de doença periodontal grave, incompetência imunológica e hiperkeratose palmo-plantar [3, 4]. A maioria dos portadores está vinculada a filhos de casamentos consanguíneos, cujos pais revelam ter a presença da mesma mutação em heterozigoto [5-7]. O diagnóstico da síndrome é feito por meio da história familiar e individual, evidências clínicas e confirmado pelo perfil genético de seus portadores [8, 9].

Observa-se significativo comprometimento do periodonto, sangramento gengival e gengiva hiperplásica, perda óssea e dentária nos indivíduos afetados pela PLS [3, 10]. A evolução da doença periodontal é rápida e acomete tanto a dentição decídua quanto a permanente, havendo agravamento no quadro durante o período de esfoliação. As espécies bacterianas identificadas são semelhantes às presentes em doenças periodontais de pacientes normotônicos [5]. De acordo com a nova classificação de doenças periodontais, a síndrome é considerada como manifestação sistêmica [11]. Outros sinais menos frequentes da PLS são calcificação intracranial, aumento na susceptibilidade a infecções bacterianas, déficit intelectual, hiperkeratose folicular e onicogribose [5, 12].

O tratamento da doença periodontal é incerto e, normalmente, não apresenta resultado satisfatório com a terapia convencional [3, 7, 13]. Exige rigoroso controle da microbiota bucal, para que seja reduzida a carga de bactérias potencialmente patogênicas e, dessa maneira, protelada ou reduzida a destruição das estruturas de suporte dos dentes [3, 14]. Ainda que sejam realizados os controles mediante terapia periodontal, a exacerbação de reações inflamatórias leva os investigadores à hipótese de que um distúrbio imunológico subjacente atue como importante componente etiológico primário ou secundário na predisposição à doença periodontal em indivíduos acometidos pela síndrome [12].

Em muitos portadores existe uma mutação no gene Catepsina C (CTSC) localizado no cromossomo 11q14, que o inativa ou reduz sua função [15, 16]. Essa inativação ou redução impõe uma diminuição na atividade das proteases lisossomais, neutrófilos hiperativos, aumento do estresse oxidativo e restrição na capacidade de retenção extracelular de neutrófilos, interferindo de maneira significativa nos

mecanismos de defesa [2, 7]. De acordo com OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), a síndrome é de número #245000 e a mutação do gene *CTSC* pode ser também um importante fator na síndrome de Haim-Munk (HMS), mas parte das características clínicas são diferenciadas nas duas síndromes, onde HMS apresenta aracnodactilia e PLS não. Assim, a avaliação do perfil imunológico desses pacientes torna-se essencial para a adoção de medidas preventivas que possam reduzir os efeitos verificados pela imunossupressão existente.

Uma hipótese proposta por Sadik et al. 2012 é de que os pacientes PLS produzem mais citocinas pró-inflamatórias para compensar a sua função reduzida de neutralizar leucotoxinas e eliminar *A. actinomycetemcomitans*, por isso é importante estudos sobre esse assunto. A função das citocinas é importante para entendermos a DP nesses pacientes e sua resposta inflamatória/imune. O *TNF- α* estimula a resposta inflamatória do organismo e outras citocinas ligadas a infecções. A *IL-3* está associada ao sistema imune e funciona em conjunto com outras citocinas regulando a resposta inflamatória. A *CAPN1* ainda não foi bem estudada mas participa em processos como mobilidade celular e na progressão do ciclo celular. O *VIM* está ligado a manutenção da integridade celular e está associado a regeneração de tecidos periodontais.

Diante da hipótese de que a PLS esteja associada a um distúrbio imunológico, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil imunológico de três irmãs portadoras da síndrome e a expressão dos genes da Interleucina 3 (*IL-3*) e do Fator de Necrose Tumoral (*TNF- α*) em ligamento periodontal e polpa dentária de uma delas. Também foi avaliada a expressão dos genes da Calpain 1 (*CAPN1*) na polpa e o Vimentin (*VIM*) no ligamento periodontal. Adicionalmente, analisar os resultados obtidos de forma descritiva em conjunto das condições clínicas identificadas em cada uma.

2.2 METODOLOGIA

Foram selecionados quatro indivíduos, sendo três irmãs, filhas de casamento consanguíneo, com características clínicas compatíveis com a síndrome de Papillon-Lefèvre e um paciente saudável. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília (UnB) - CAAE 99311218.0.0000.0030. Todos os indivíduos foram informados verbalmente e por escrito do objetivo do estudo e convidados a assinarem o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Todos os indivíduos foram selecionados em clínica particular e o diagnóstico da síndrome foi realizado pelo cirurgião-dentista. As pacientes portadoras da PLS fizeram acompanhamento nessa clínica por 4 anos e, atualmente, encontram-se com 19, 17 e 16 anos de idade. As características encontradas nas 3 irmãs foram: hiperqueratose palmo-plantar, doença periodontal e perda prematura dos dentes decíduos e permanentes. Os pacientes foram submetidos a exame clínico minucioso, com anamnese, exame físico bucal, sondagem periodontal, além de investigação das características sistêmicas relacionadas. Também foram submetidos a exames fotográficos e radiográficos para acompanhamento. Foram solicitados hemograma completo e coagulograma para as portadoras da síndrome.

Após a realização dos exames complementares, foi realizada coleta de amostras de polpa dentária e ligamento periodontal de uma paciente portadora da síndrome, de um terceiro molar de um paciente do grupo controle (CT1) e um pré-molar por indicação ortodôntica do grupo controle (CT2) para a realização deste estudo. Os pacientes do grupo controle são pacientes jovens, de idade similar das pacientes PLS e do sexo feminino. Das 3 pacientes PLS, apenas uma ainda possuía mais de 10 dentes presentes na cavidade oral no momento da seleção. As duas outras irmãs possuíam apenas os terceiros molares, que não foram afetados pela doença periodontal por estarem inclusos, não sendo necessária sua extração até o momento. Os dentes da paciente acometida pela síndrome foram extraídos devido à perda de inserção periodontal, imposta pela própria PLS. Já do grupo controle, foram extraídos os dentes por indicação ortodôntica.

Os dentes extraídos foram seccionados e a polpa dentária imediatamente transferida para microtubos estéreis do tipo *Eppendorf* livres de DNase e RNase, contendo 800µL de Trizol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Em seguida, as amostras foram processadas para extração de RNA, seguindo o protocolo de extração em Trizol e síntese de cDNA utilizando o kit *Quantitect Reverse Transcriptase* (Qiagen). Após homogeneizar a amostra em Trizol, clorofórmio foi adicionado para separar, por centrifugação, o RNA numa camada aquosa superior transparente, uma interfase e uma camada orgânica inferior vermelha (contendo DNA e proteínas). O RNA foi precipitado da camada aquosa com isopropanol e lavado com etanol para remover as impurezas e, em seguida, suspenso em água ultrapura para síntese de cDNA. As amostras de cDNA que foram obtidas serviram como padrão para diagnóstico de expressão por PCR em tempo real (qPCR) dos genes de interesse

(*TNF- α* , *IL3*, *VIM* e *CAPN1*) e usadas em triplicata. A fração de expressão do gene de interesse para cada grupo foi normalizado em relação à expressão do gene de referência (Glicerol-3-fosfato desidrogenase, GAPDH) e calculado em relação ao grupo controle (gene fold = $2^{\Delta\Delta ct}$ +/- stdv; onde $\Delta\Delta ct = \Delta ct$ do grupo teste – Δct do grupo controle; Δct do grupo = ct médio do gene alvo – ct médio do gene de referência, ct = média dos ciclos de detecção dos *amplicons* no termociclador).

2.3 RESULTADOS

As características fenotípicas encontradas nessas pacientes portadoras da síndrome de PLS foram hiperqueratose palmo-plantar, perda prematura dos dentes decíduos e permanentes, doença periodontal e gengiva hiperplásica (Fig. A, B, D, E, F, G, H e I). Ainda na paciente PLS1 foi possível encontrar lesões faciais de pele (Fig. C). De acordo com o histórico descrito pela mãe, os primeiros sinais e sintomas da síndrome foram observados entre 3 e 4 anos, quando a mãe observou mobilidade nos dentes, logo em seguida, iniciou-se a perda prematura dos dentes decíduos, mas que não foi identificada inicialmente como fora da normalidade por ela. Por volta dos 6 anos foi observada a hiperqueratose palmo-plantar.



Figura A - Pé com características de hiperqueratose plantar PLS1



Figura B - Mãos com características de hiperqueratose palmar PLS1



Figura C - Lesões faciais de pele PLS1



Figura D - Radiografia panorâmica da paciente PLS1 com perda prematura da dentição permanente e grande perda óssea

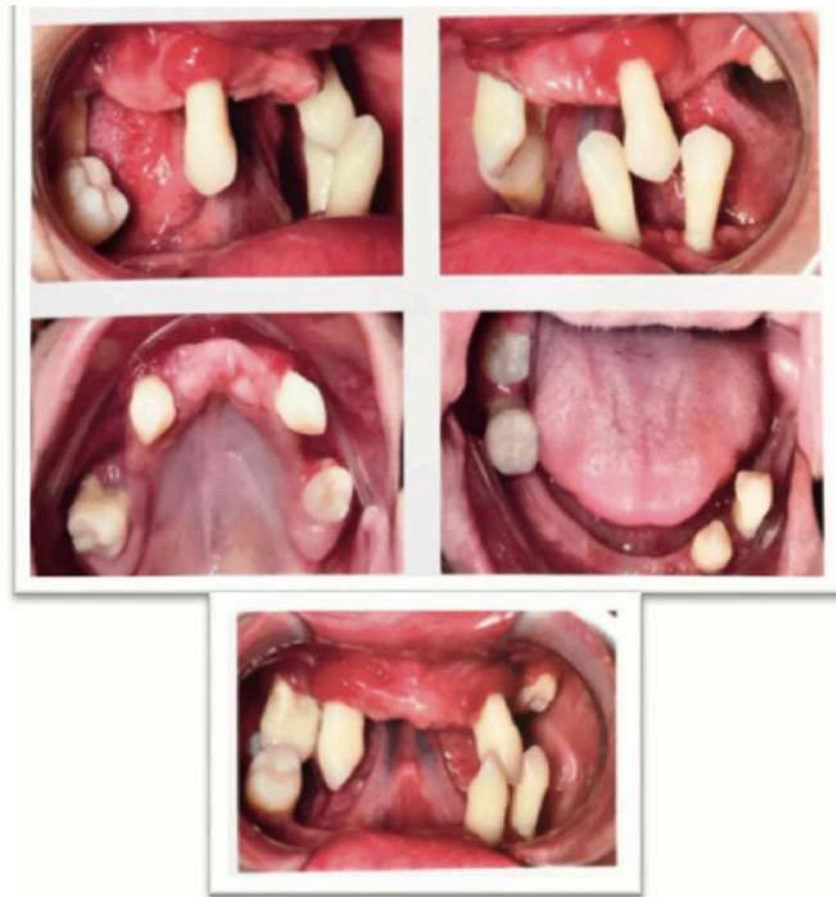


Figura E - Imagens intraorais paciente PLS1 com visível perda prematura da dentição permanente e gengiva hiperplasiada



Figura F - Radiografia panorâmica da paciente PLS2 com perda prematura da dentição permanente e grande perda óssea



Figura G - Imagens intraorais paciente PLS2 com visível perda prematura da dentição permanente e gengiva hiperplasiada



Figura H - Radiografia panorâmica da paciente PLS3 com perda prematura da dentição permanente e grande perda óssea

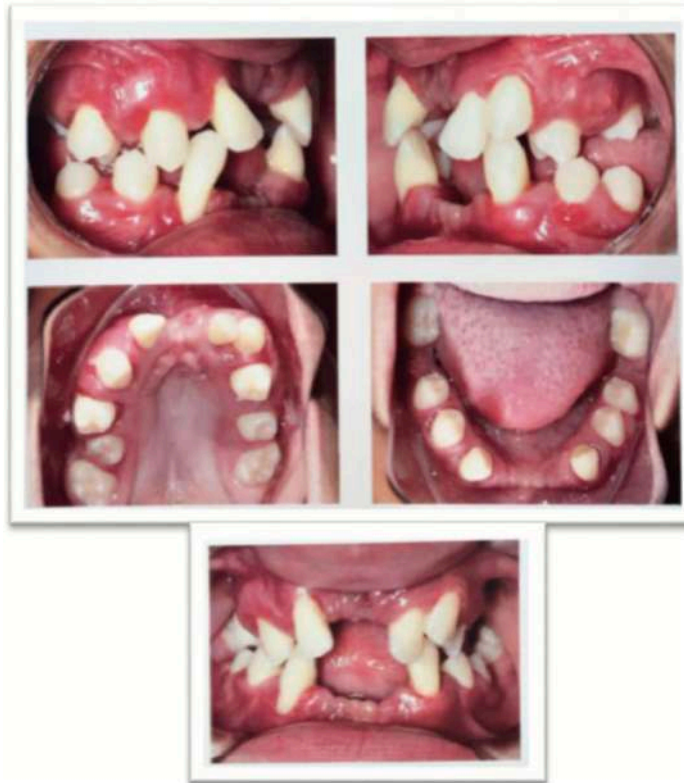


Figura I - Imagens intraorais paciente PLS3 com visível perda prematura da dentição permanente e gengiva hiperplasiada

Quando buscou tratamento odontológico na clínica colaboradora com este estudo, segundo dados obtidos nos prontuários, a paciente PLS1 inicialmente se encontrava com 10 dentes em boca, sendo 3 terceiros molares que permanecem em sua boca até hoje, pois não foram afetados pela doença periodontal. A paciente PLS2 inicialmente se encontrava com 19 dentes na boca, dentre esses, 4 terceiros molares que permanecem em sua boca por também não terem sido afetados pela doença periodontal. Paciente PLS3 inicialmente possuía 22 dentes, sendo os 4 terceiros molares inclusos e, atualmente, possui apenas os terceiros molares. Também foi possível notar grande mobilidade à sondagem e bolsas profundas nessas pacientes.

Foram feitas diversas tentativas de tratamento nesses pacientes como raspagem supra e subgengival, uso de medicação intra-oral: amoxicilina com clavulanato de potássio e metronidazol; uso de enxaguatório bucal: digliconato de clorexidina; e uso de laserterapia nas bolsas periodontais, mas todas sem sucesso.

Os resultados obtidos pela análise de PCR em tempo real das amostras de polpa dentária e ligamento periodontal com primers de *TNF- α* , *IL-3*, *CAPN1* e *VIM* encontram-se descritos nos gráficos: 1 a 6. Foi realizada a média e desvio padrão da

quantificação dos resultados. Os resultados do *fold* de expressão foram superiores nessa paciente portadora da síndrome quando comparado ao grupo controle, tanto na polpa dentária quanto no ligamento periodontal. A expressão da *IL-3* na polpa dentária da amostra PLS encontra-se quase três vezes superior quando comparado à amostra controle (gráfico 1 e 2). A *IL-3* no ligamento periodontal na paciente PLS também se encontra superexpressa, sendo quase cento e vinte vezes superior quando comparada à amostra controle 1 (gráfico 3) e quase seiscentas vezes superior no controle 2 (gráfico 4). Com relação ao *TNF- α* , tanto na polpa quanto no ligamento os genes se encontram em superexpressão, sendo um pouco mais de três vezes superiores na polpa da paciente PLS no CT1 (gráfico 5), uma vez superior no CT2 (gráfico 6), duas vezes superior no ligamento periodontal no CT1 (gráfico 7) e mais de 50 vezes superior no CT2 (gráfico 8). Com relação à expressão de *CAPN1* em polpa, no paciente síndrômico é similar à amostra controle, sendo quase duas vezes superior quando comparada à amostra controle (CT1) (gráfico 9) e possui uma expressão um pouco menor no CT2 (gráfico 10). Acerca da expressão do *VIM* em ligamento periodontal, na paciente PLS é um pouco inferior quando comparada à amostra controle CT1 (gráfico 11) mas cinco vezes superior quando comparado a amostra CT2 (gráfico 12).

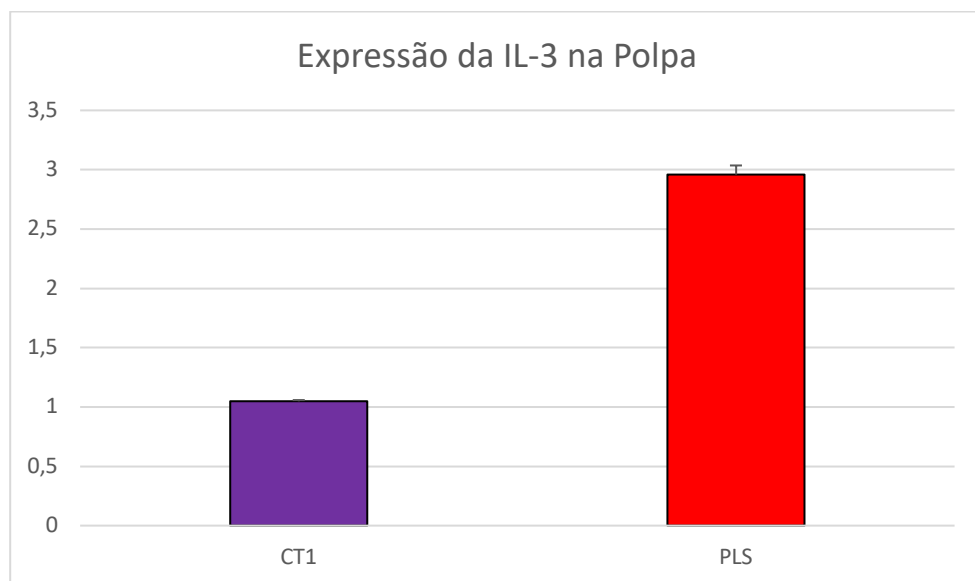


Gráfico 1 – Fold de expressão da *IL-3* em polpa por qPCR. Grupo controle (CT1) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.

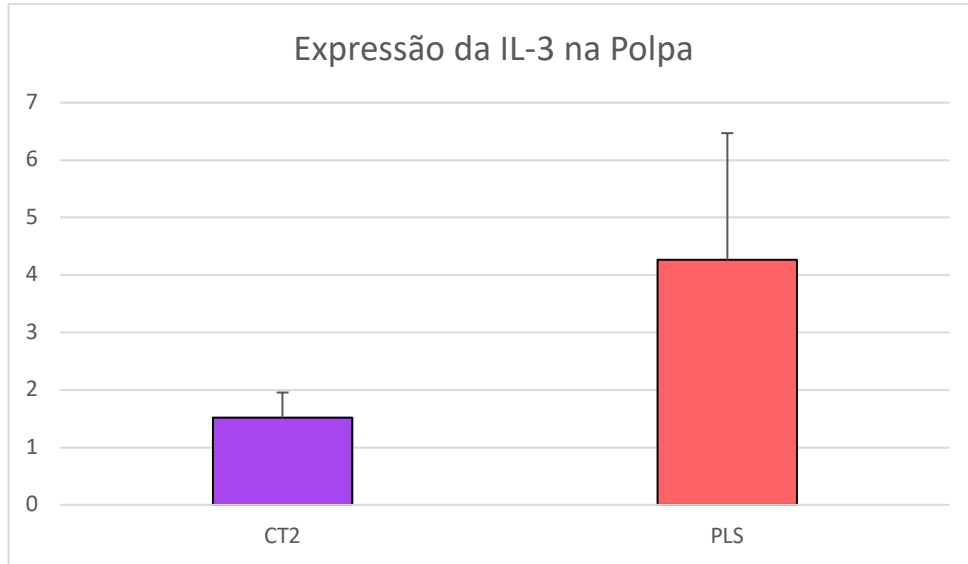


Gráfico 2 – Fold de expressão da IL-3 em polpa por qPCR. Grupo controle (CT2) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.

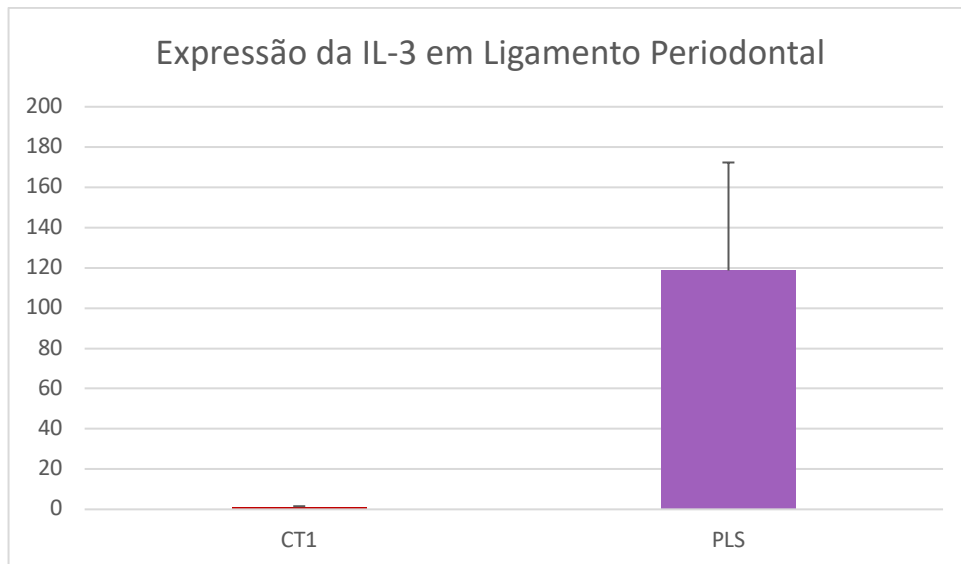


Gráfico 3 – Fold de expressão da IL-3 em ligamento periodontal por qPCR. Grupo controle (CT1) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.

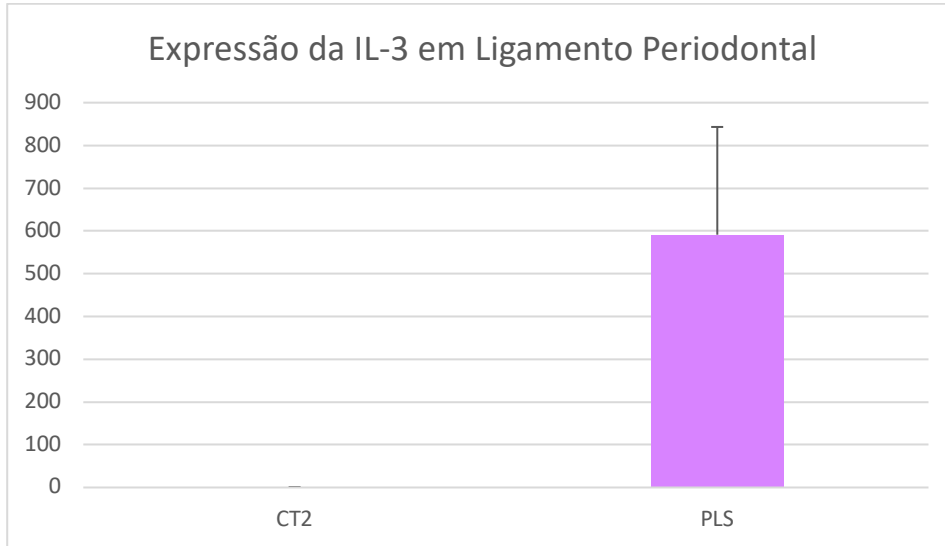


Gráfico 4 – Fold de expressão da IL-3 em ligamento periodontal por qPCR. Grupo controle (CT2) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.

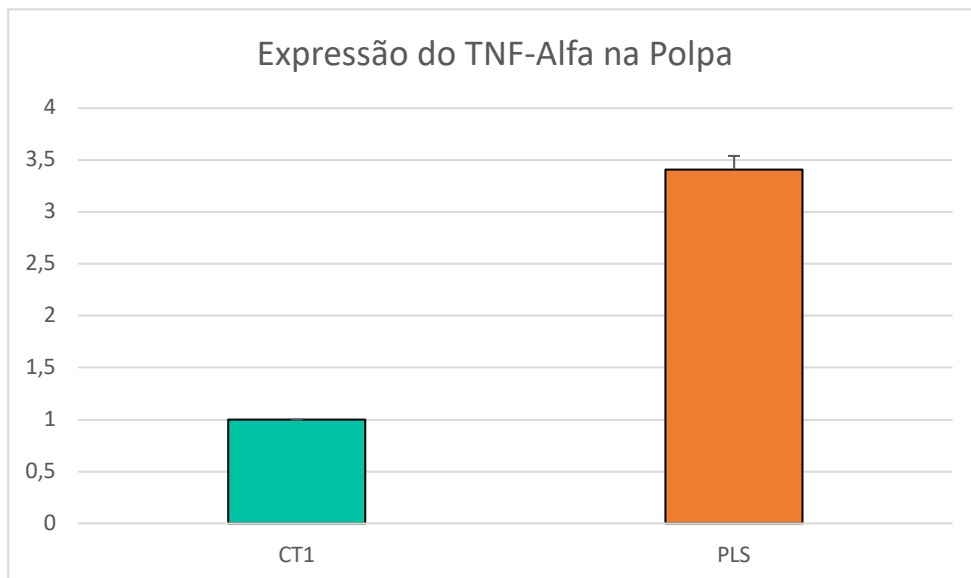


Gráfico 5 – Fold de expressão do TNF- α em polpa por qPCR. Grupo controle (CT1) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.

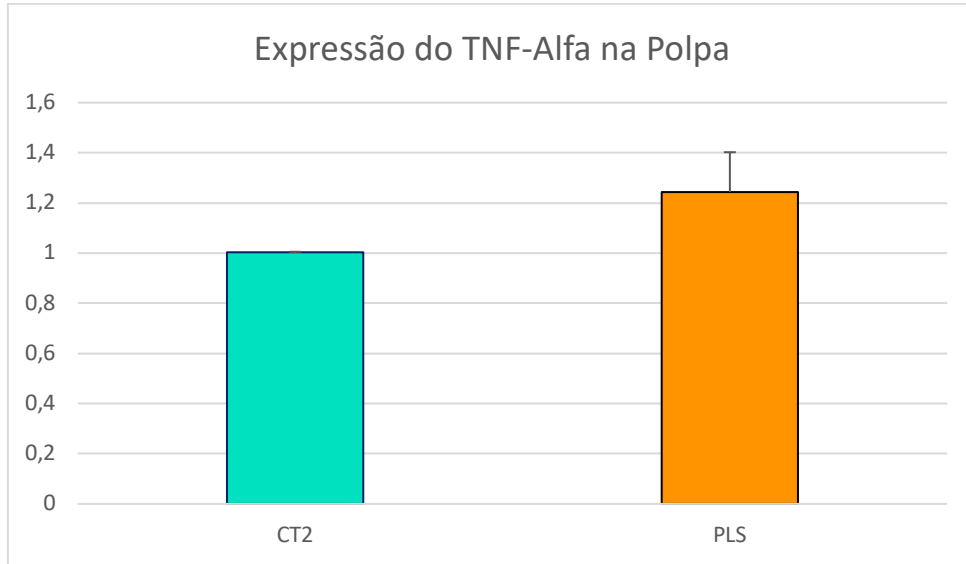


Gráfico 6 – Fold de expressão do TNF- α em polpa por qPCR. Grupo controle (CT2) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.

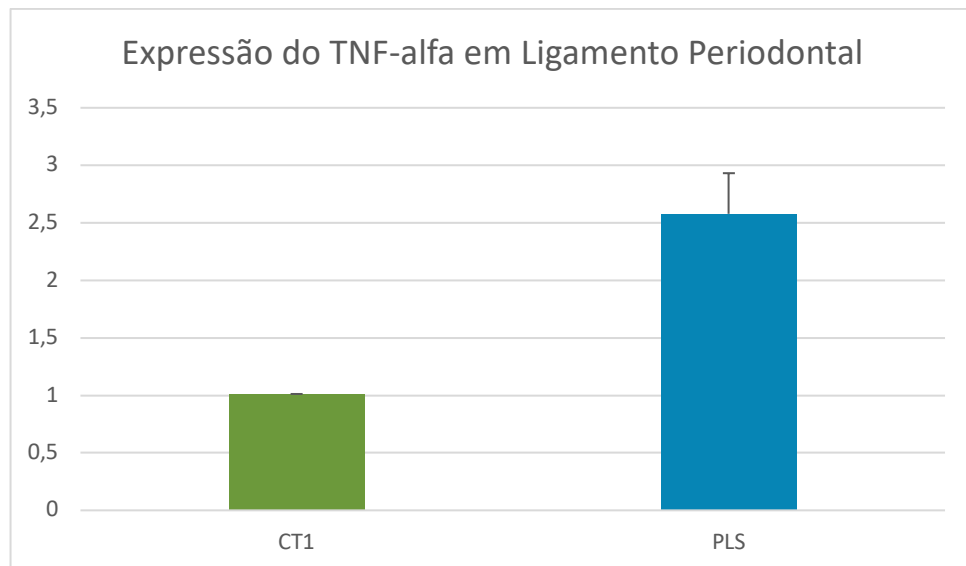


Gráfico 7 – Fold de expressão do TNF- α em ligamento periodontal por qPCR. Grupo controle (CT1) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.

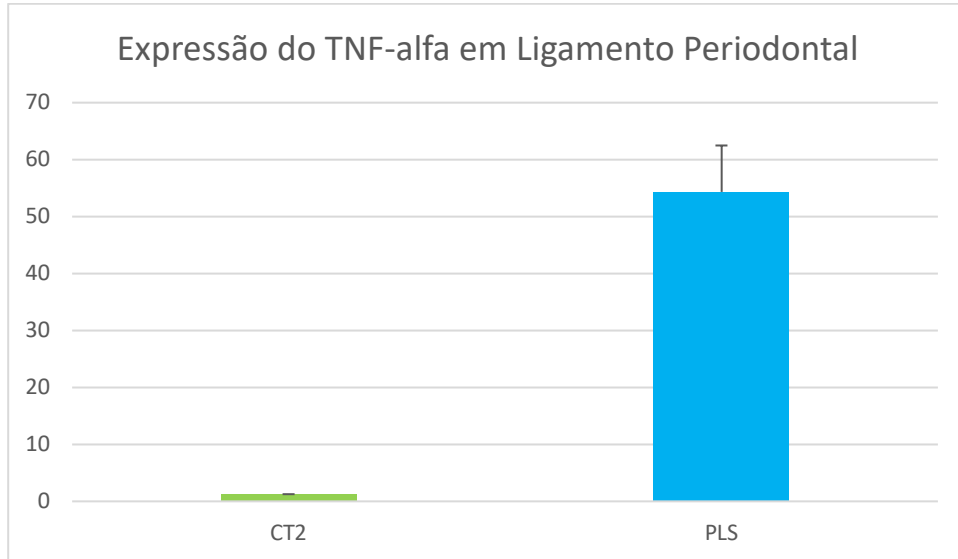


Gráfico 8 – Fold de expressão do TNF- α em ligamento periodontal por qPCR. Grupo controle (CT2) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.

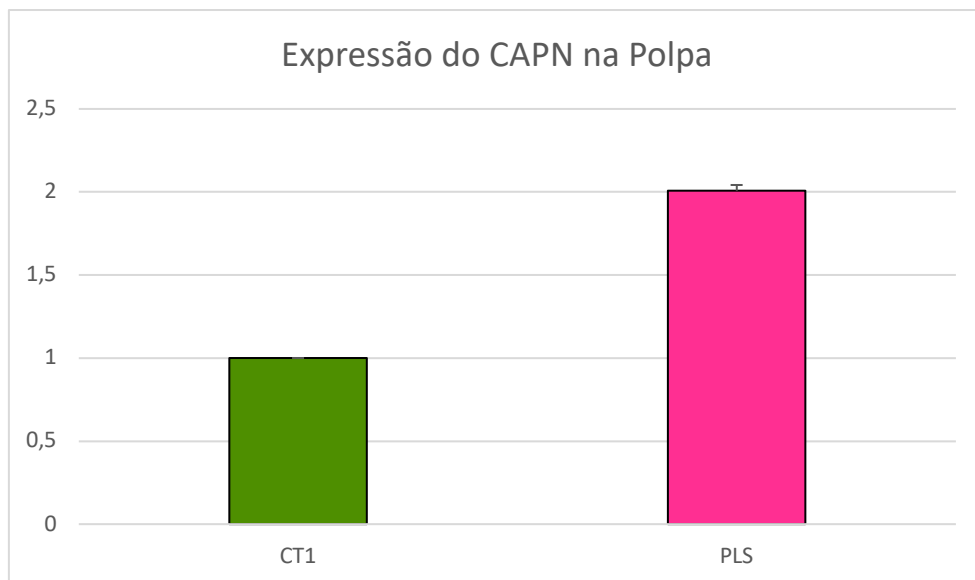


Gráfico 9 – Fold de expressão do CAPN1 em polpa por qPCR. Grupo controle (CT1) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.

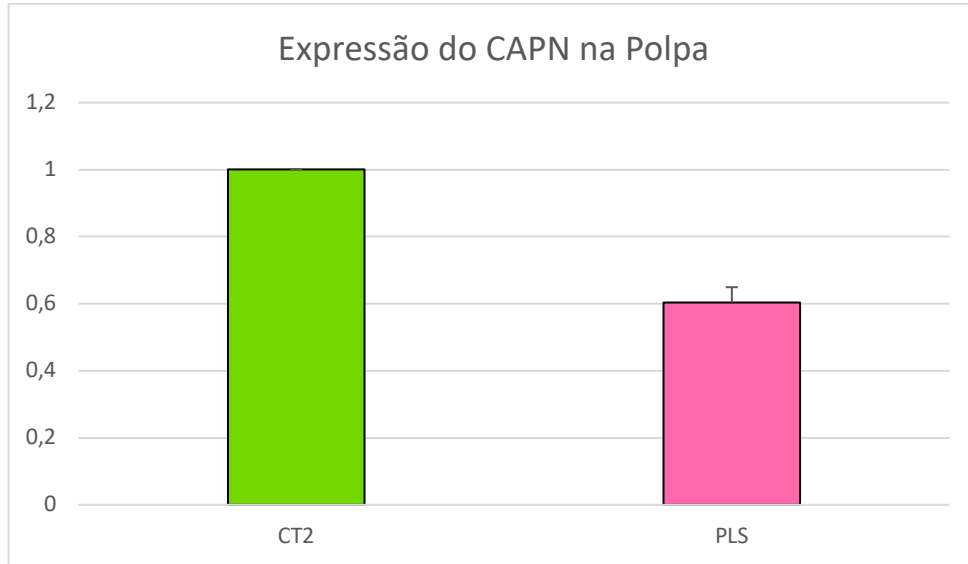


Gráfico 10 – Fold de expressão do CAPN1 em polpa por qPCR. Grupo controle (CT2) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.

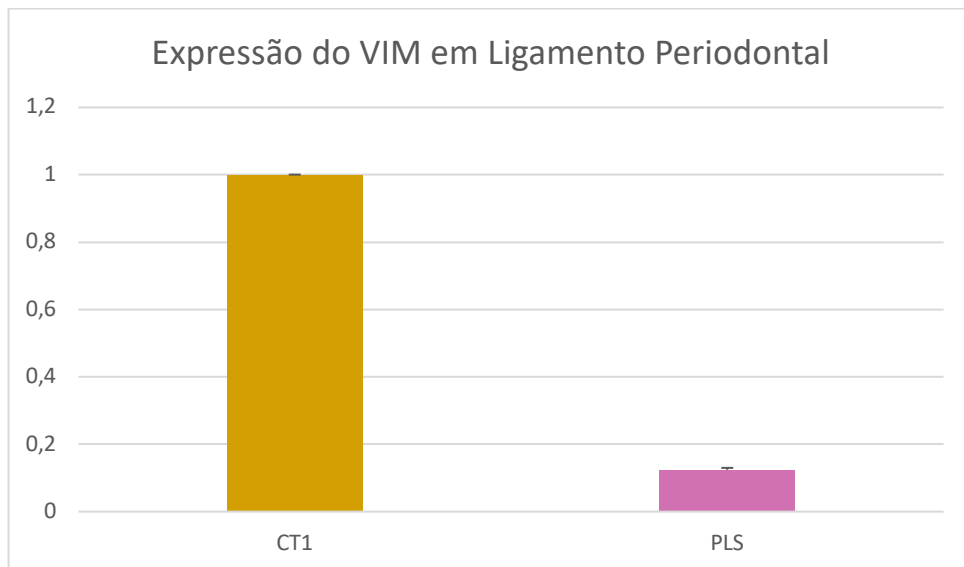


Gráfico 11 – Fold de expressão do VIM em Ligamento Periodontal por qPCR. Grupo controle (CT1) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.

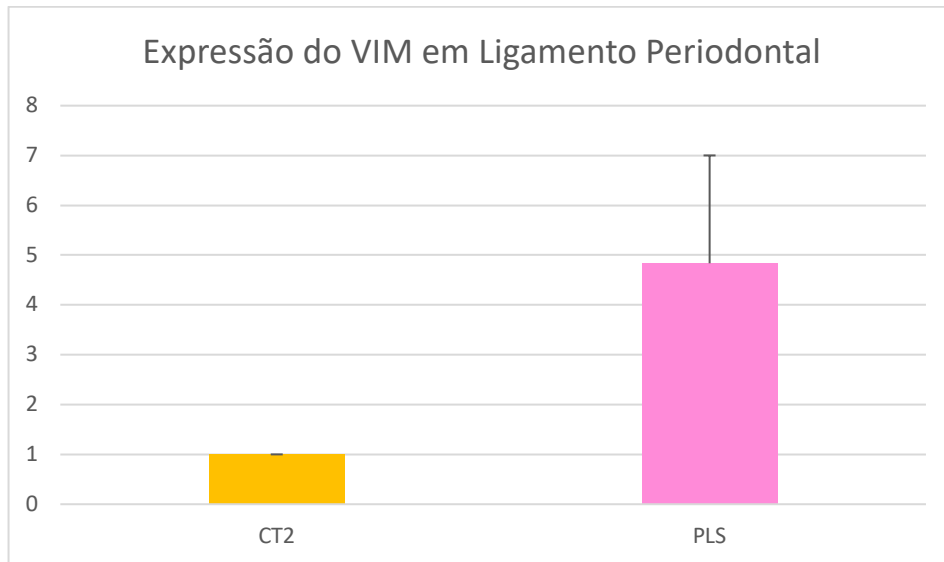


Gráfico 12 – Fold de expressão do VIM em Ligamento periodontal por qPCR. Grupo controle (CT2) e paciente com a síndrome (PLS). Média e Desvio Padrão.

Com relação ao hemograma e coagulograma nas pacientes PLS, o resultado encontra-se dentro do valor de referência, não sendo encontrada nenhuma alteração.

2.4 DISCUSSÃO

No presente trabalho pode ser observado que os níveis de *IL-3*, *TNF- α* e *VIM* encontram-se mais elevados no paciente síndrômico PLS, indicando significativa influência do quadro de alteração inflamatória relacionada a esses marcadores e um possível mecanismo de compensação da resposta imune nesse paciente. Também deve ser levado em consideração que as citocinas podem se encontrar elevadas devido à alta susceptibilidade a infecções bacterianas que esses pacientes podem ter. O alto valor encontrado pode também estar relacionado a perda precoce de dentes decíduos e permanentes. Os resultados obtidos nesse trabalho são apenas descritivos e não foi realizada a análise estatística devido a amostra (n) ser pequena.

O grupo controle é composto em CT1 e CT2. Onde CT1 é um terceiro molar incluído, em processo de erupção, no qual seu ligamento periodontal e tecidos adjacentes estão em formação. O CT2 é um pré-molar em oclusão, onde seu processo de formação já estava completo, juntamente com seus tecidos adjacentes. Os *fold*s de expressão foram calculados separadamente nos dois controles (CT1 e CT2), devido a características individuais de cada elemento dentário.

O *VIM* está bem descrito no ligamento periodontal, mas possui pouca informação na sua expressão na regeneração do ligamento periodontal. O alto *fold* de expressão encontrado de *VIM* no CT1 pode ser justificado devido a formação de ligamento periodontal na formação do dente, como o CT1 é um terceiro molar em processo de erupção.

Os achados deste estudo corroboram a hipótese de que a síndrome de Papillon-Lefèvre apresenta forte relação com a mutação genética de marcadores de células imunológicas e inflamatórias [2, 7, 17]. Desses marcadores, a Catepsina C parece possuir relação com fenômenos imunológicos e inflamatórios relacionados às características evidenciadas nos portadores da síndrome [2, 7]. No entanto, há relatos de sua existência mesmo sem essa mutação, sinalizando que a etiologia da PLS é significativamente mais complexa [18].

Outras características consistem na existência de uma ação em conjunto entre a autofagia e a degradação lisossômica decorrentes de um turnover celular correto de proteínas. Alterações patológicas decorrem muitas vezes do acúmulo de substratos em autofagolisossomos causado pela deficiência da enzima lisossômica. Entretanto, ainda não existem estudos que evidenciem a ligação entre a Catepsina C e a autofagia. Embora não tenha sido o objetivo principal do presente trabalho, estudos sugerem que o mecanismo de interferência de mutação da Catepsina C deva ser realizado para um melhor entendimento sobre o assunto [2].

Em síndrômicos, os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) produzem mais citocinas pró-inflamatórias para compensarem sua capacidade reduzida para neutralizar leucotoxina e eliminar bactérias como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. A produção de mais interleucina-8 (*IL-8*) resulta em maior atração de PMNs. Ocorre uma resposta do organismo ao aumento da ineficácia da fagocitose, aumentando os níveis de interleucina-1 β (*IL-1 β*) e interleucina-6 (*IL-6*), acelerando a reabsorção óssea. Assim, identifica-se uma tendência de aumento das *IL-8*, *IL-6* e *IL-1 β* em portadores da síndrome, porém, esse aumento não possui significância estatística, devido à síndrome ser rara e à amostra ser pequena, heterogênea em relação à idade e etnia [13].

Vale ressaltar que muitos estudos exibem uma dificuldade decorrente do perfil raro da síndrome, os quais descrevem constantemente amostras consideradas pequenas para resultados mais significativos estatisticamente. Apesar do limite

quanto ao número de indivíduos, estudos como este podem trazer respostas científicas relevantes para a compreensão e melhor tratamento de doenças raras como a PLS, além da importância para realização de futuros estudos de metanálise. As limitações deste estudo piloto é a sua pequena amostra, mas é de grande importância pois gera hipóteses e dados para pesquisas, para entendermos melhor as vias de inflamação futuramente investigadas e marcadores de ligamento periodontal e tecido pulpar. As hipóteses levantadas devem ser futuramente avaliadas em um projeto de pesquisa.

2.5 CONCLUSÃO

Este estudo evidencia como a síndrome de Papillon-Lefèvre afeta a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela PLS e como seu fenótipo é agressivo. Também é pertinente destacar que a portadora da síndrome analisada, na qual foi realizada a coleta da polpa e do ligamento periodontal, apresenta significativa superexpressão de genes característicos de resposta inflamatória em tecidos pulpaes e de ligamento periodontal, em especial *TNF- α* , *IL-3* e *VIM*. Possivelmente devido à raridade e número limitado de amostras em PLS, os mecanismos moleculares envolvidos nesse prejuízo imunológico ainda são desconhecidos, mais estudos devem ser conduzidos com este propósito.

2. REFERÊNCIAS

1. Bhavsar MV, Brahmabhatt NA, Sahayata VN, Bhavsar NV. Papillon-lefevre syndrome: Case series and review of literature. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2013;17(6):806.
2. Bullón P, Castejón-Vega B, Román-Malo L, Jimenez-Guerrero MP, Cotán D, Forbes-Hernandez TY, et al. Autophagic dysfunction in patients with Papillon-Lefevre

syndrome is restored by recombinant cathepsin C treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018;142(4):1131-43. e7.

3. Jordan RC. Diagnosis of periodontal manifestations of systemic diseases. *Periodontology 2000*. 2004;34(1):217-29.

4. Tumen DS, Tumen EC, Gunay A, Lacin N, Cetin SG. The typical appearance and CBCT images of the patient with papillon-lefevre syndrome: a case report. *Journal of International Dental and Medical Research*. 2015;8(3):128.

5. AlBarrak ZM, Alqarni AS, Chalisserry EP, Anil S. Papillon–Lefèvre syndrome: a series of five cases among siblings. *Journal of medical case reports*. 2016;10(1):260.

6. Patel S, Davidson L. Papillon–Lefèvre syndrome: a report of two cases. *International journal of paediatric dentistry*. 2004;14(4):288-94.

7. Soliman H, Eldeen HG, Mustafa MI. A novel nonsense mutation in cathepsin C gene in an Egyptian patient presenting with Papillon–Lefèvre syndrome. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2015;16(4):387-92.

8. Haneke E. The Papillon-Lefèvre syndrome: Keratosis palmoplantaris with periodontopathy. *Human genetics*. 1979;51(1):1-35.

9. Bhargava M, Chaudhary D, Gill S, Arora K, Kalra H. Papillon-Lefèvre Syndrome: Case Report and its Differential Diagnosis, Complications and Management. *Journal of Oral Health and Research*. 2011;2(2):85.

10. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*. 2014;42(D1):D633-D42.

11. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of periodontology*. 2018;89:S1-S8.
12. Hart TC, Hart PS, Bowden DW, Michalec MD, Callison SA, Walker SJ, et al. Mutations of the cathepsin C gene are responsible for Papillon-Lefevre syndrome. *Journal of medical genetics*. 1999;36(12):881-7.
13. Sadik CD, Noack B, Schacher B, Pfeilschifter J, Mühl H, Eickholz P. Cytokine production by leukocytes of Papillon-Lefèvre syndrome patients in whole blood cultures. *Clinical oral investigations*. 2012;16(2):591-7.
14. Padawe DS, Takate VS, Gunjekar TU. Papillon Lefevre's Syndrome: An unusual case with severe Periodontitis and Minimal Dermal Involvement. *JIDA: Journal of Indian Dental Association*. 2014;8(4).
15. Fischer J, Blanchet-Bardon C, Prud'homme J-F, Pavek S, Steijlen PM, Dubertret L, et al. Mapping of Papillon-Lefevre syndrome to the chromosome 11q14 region. *European Journal of Human Genetics*. 1997;5:156-60.
16. Toomes C, James J, Wood AJ, Wu CL, McCormick D, Lench N, et al. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nature genetics*. 1999;23(4):421-4.
17. Alkhiary YM, Jelani M, Almramhi MM, Mohamoud HSA, Al-Rehaili R, Al-Zahrani HS, et al. Whole-exome sequencing reveals a recurrent mutation in the cathepsin C gene that causes Papillon-Lefevre syndrome in a Saudi family. *Saudi journal of biological sciences*. 2016;23(5):571-6.

18. Khan FY, Jan SM, Mushtaq M. Papillon–Lefevre syndrome (PLS) without cathepsin C mutation: A rare early onset partially penetrant variant of PLS. *The Saudi dental journal*. 2014;26(1):25-8.

CAPÍTULO 3

FENÓTIPO ORAL E MICROBIOMA SALIVAR DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME DE PAPILLON-LEFÈVRE

CAPÍTULO 3 – FENÓTIPO ORAL E MICROBIOMA SALIVAR DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME DE PAPILLON-LEFÈVRE²

RESUMO

A síndrome de Papillon-Lefèvre (PLS) é uma doença autossômica, recessiva e rara, cujas principais características incluem hiperqueratose palmo-plantar e edentulismo prematuro, devido a uma periodontite avançada (anteriormente periodontite agressiva). O objetivo deste estudo é caracterizar o fenótipo oral, incluindo parâmetros salivares e microbioma salivar de três irmãs portadoras de PLS e compará-los. Duas irmãs desdentadas (PLSTL1 e PLSTL2) e uma irmã possui a maioria dos dentes na cavidade oral (PLST). O DNA total foi extraído da saliva não estimulada, o RNA, o 16S rRNA foi amplificado e os amplicons sequenciados na plataforma Ion PGM. As variantes da sequência do amplicon (ASVs) foram obtidas usando o pipeline DADA2 e a taxonomia foi atribuída usando o SILVA v.132. As características fenotípicas principais da PLS foram perda óssea e perda prematura da dentição decídua e permanente. A irmã PLST apresenta uma periodontite avançada com sangramento gengival e supuração, correspondendo a quadro de periodontite avançada como manifestação de doença sistêmica, estágio IV, grau C. As três irmãs PLS apresentaram hipossalivação como um possível desfecho secundário da síndrome. Curiosamente, a microbiota salivar da PLST foi dominada pela bactéria não cultivada *Bacteroidales* (F0058) e pela *Fusobacterium*, *Treponema* e *Sulfophobococcus* (domínio Archaea). *Streptococcus*, *Haemophilus* e *Caldivirga* (Archaea) dominaram o microbioma da irmã PLSTL1, enquanto PLSTL2 teve alta abundância de *Lactobacillus* e *Porphyromonas*. Este estudo foi o primeiro a mostrar alta abundância de organismos pertencentes ao domínio Archaea compondo um microbioma central na saliva humana. Em conclusão, o indivíduo PLST possui uma microbiota diferente daquela reconhecida previamente pela agressividade da periodontite. Devido a uma catepsina C ineficaz, o comprometimento dos neutrófilos forneceu um ambiente favorável para o microbioma da PLS. As interações de *Bacteroidales* F0058, *Caldivirga* e *Sulfophobococcus* com o consórcio microbiano de PLS merecem investigações futuras. Terapia periodontal tradicional não é eficiente em pacientes PLS. Desvendar o microbioma da PLS é essencial na busca do tratamento apropriado e evita a perda precoce dos dentes.

Key-words: Papillon-Lefèvre Disease, Cathepsin C, periodontal infection, Saliva, Microbiology, Periodontitis

² Artigo baseado na revista *Frontiers in Microbiology*

ABSTRACT

Papillon-Lefèvre syndrome (PLS) is an autosomal recessive rare disease, which main characteristics include palmoplantar hyperkeratosis and premature edentulism due to advanced periodontitis (formerly aggressive periodontitis). This study aimed to characterize the oral phenotype, including salivary parameters, and the salivary microbiome of three PLS sisters, comparatively. Two sisters were toothless (PLSTL1 and PLSTL2), and one sister had most of the teeth in the oral cavity (PLST). Total DNA was extracted from the unstimulated saliva, and the amplicon sequencing of the 16S rRNA gene fragment was performed in an Ion PGM platform. The amplicon sequence variants (ASVs) were obtained using the DADA2 pipeline, and the taxonomy was assigned using the SILVA v.132. The main phenotypic characteristics of PLS were bone loss and premature loss of primary and permanent dentition. The PLST sister presented advanced periodontitis with gingival bleeding and suppuration, corresponding to the advanced periodontitis as a manifestation of systemic disease, stage IV, grade C. All three PLS sisters presented hyposalivation as a possible secondary outcome of the syndrome. Interestingly, PLST salivary microbiota was dominated by the uncultured bacteria *Bacteroidales* (F0058), *Fusobacterium*, *Treponema*, and *Sulfophobococcus* (Archaea domain). *Streptococcus*, *Haemophilus*, and *Caldivirga* (Archaea) dominated the microbiome of the PLSTL1 sister, while the PLSTL2 had higher abundances of *Lactobacillus* and *Porphyromonas*. This study was the first to show a high abundance of organisms belonging to the Archaea domain comprising a core microbiome in human saliva. In conclusion, PLST individual does have a microbiota different from that of the periodontitis's aggressiveness previously recognized. Due to an ineffective cathepsin C, the impairment of neutrophils probably provided a favorable environment for the PLS microbiome. The interactions of *Bacteroidales* F0058, *Caldivirga*, and *Sulfophobococcus* with the microbial consortium of PLS deserves future investigation. Traditional periodontal therapy is not efficient in PLS patients. Unraveling the PLS microbiome is essential in searching for appropriate treatment and avoiding early tooth loss.

Keywords: Doença de Papillon-Lefèvre, Cathepsin C, Saliva, Microbiology, Periodontitis.

3.1 INTRODUÇÃO

Papillon e Lefèvre descreveram pela primeira vez a síndrome de Papillon-Lefèvre (PLS) em 1924 [1]. A PLS é uma condição rara, hereditária, autossômica e recessiva que afeta 1 a 4 indivíduos por milhão [2]. Geralmente, casamentos consanguíneos são a origem de indivíduos com PLS [3,4]. As características fenotípicas principais da PLS são hiperkeratose palmo-plantar e a perda prematura da dentição decídua e permanente. O processo de edentulismo da PLS começa com uma periodontite agressiva [5]. No período da esfoliação dentária, o tecido gengival dos pacientes PLS torna-se hiperplásico, hemorrágico, ocorre uma grande perda óssea na maxila e mandíbula, com exposição de cimento, mobilidade dentária que culmina na perda dentária [6-8]. Portanto, é esperado uma má qualidade de vida na infância, pois corresponde ao período mais destrutivo da doença. A condição periodontal e perda dos dentes gera uma alta sensibilidade nos pacientes com PLS e uma má qualidade na dieta [9]. Esses indivíduos possuem um aumento na incidência de infecções cutâneas e orais, o que levou a uma hipótese de um distúrbio imunológico substancial na primeira linha de defesa celular. O comprometimento do sistema imune pode explicar a predisposição a infecções orais e periodontite na PLS como um componente etiológico primário.

A PLS é resultante da mutação do gene da catepsina C (*CTSC*), também conhecido como dipeptidil peptidase 1 (DPPI), localizado no cromossomo 11q14. A mutação da *CTSC* produz uma cisteína protease inativa ou com função reduzida [10-12]. A catepsina C é uma enzima lisossomal essencial na cascata de ativação de serina proteases de células imunes e inflamatórias e outras linhagens celulares. A maioria das proteínas que exigem o processamento da catepsina C são essenciais para o funcionamento adequado do sistema imune inato. Elastase de neutrófilos, proteinase-3, granzimas A, B e C são exemplos de proteínas que dependem da clivagem mediada pela catepsina C para ativação [13]. Bullón *et al.* (2018) mostraram acumulação de autofagossomo em fibroblastos mutantes da pele de paciente com PLS. A acumulação do autofagossomo foi associada a alterações no estado oxidativo/antioxidante, redução do consumo de oxigênio e acentuada disfunção autofágica. As células imunes e inflamatórias também mostraram um comportamento

disfuncional na PLS. Por exemplo, neutrófilos demonstram hiperatividade com aumento no estresse oxidativo e redução na capacidade de formação estruturas de armadilha extracelular dos neutrófilos (NET's) [14, 15]. As NET's são estruturas importantes de defesa, compostas por DNA, cromatina e proteínas bactericidas [13]. Sørensen *et al.* (2014) mostraram que os neutrófilos dos pacientes PLS carecem ou tiveram uma redução significativa da quantidade de elastase de neutrófilos (NE), catepsina G (CTSG), proteinase 3 (PR3) e azurocidina (CAP3). A azurocidina é membro das serina protease neutrófilas, com intensa atividade quimiotática para monócitos, e a formação de NETs depende da presença de NE. Uma produção excessiva ou diminuída de NET pode levar a um transtorno autoimune ou inflamatório, como a ativação do inflamassoma, interferindo significativamente no mecanismo de defesa dos pacientes com PLS. Relatórios científicos de camundongos CTSC-/- mostram que granulócitos neutrófilos são alterados na ausência de CTSC [16]. Além disso, a atividade de neutrófilos serina elastase (NE) foi marcadamente reduzida para cerca de 50% nos granulócitos nocauteados. Outros neutrófilos serina elastase, catepsina G (CTSG) e proteinase 3 (PR3) também foram fortemente reduzidos. A clivagem da molécula de contato célula-célula E-caderina também foi prejudicada na ausência de CTSC, sugerindo que a infiltração prejudicada do tecido de neutrófilos CTSC-/- é causada pela clivagem reduzida da caderina E nas junções aderentes, em vez de pela motilidade reduzida de neutrófilos [16]. Em conjunto, as mutações no gene das catepsina C e a disfunção das células imune/inflamatórias podem explicar a maior propensão dos pacientes PLS à disbiose oral e proliferação de biofilmes periodontais. Ainda mais crítico, os indivíduos PLS podem apresentar um biofilme diversificado, podendo ser desafiador para o controle com o tratamento convencional.

A microbiota oral em disbiose é um fator relevante em diversas condições orais, como cáries, periodontite (PD), lesões apicais, osteítes alveolares e tonsilites. Também possui um papel importante em certas doenças sistêmicas, como doença cardiovascular, diabetes mellitus, pneumonia, e partos prematuros [17], posto que o conhecimento da comunidade microbiana é essencial para avaliar os efeitos desses microrganismos no hospedeiro e pode ajudar na evolução dos tratamentos de distúrbios bucais [18]. Porém, o microbioma oral na PLS ainda não foi totalmente descrito ou relacionado ao fenótipo da síndrome. Esse gap de conhecimento pode explicar, em partes, porque o tratamento da periodontite (PD) não é eficiente nesses pacientes [19]. A hipótese para a terapia da PD malsucedida na PLS é a combinação

da existência de espécies patogênicas, o início da inflamação [20,21] e o distúrbio imunológico causado pela mutação da catepsina C, que não é bem compreendida [19, 21]. Portanto, a compreensão da tríade “microbiota oral, resposta imune/inflamatória e mutação da catepsina C” é obrigatória para a busca de um tratamento sistêmico e periodontal bem-sucedido para PLS, atualmente indisponível. Esse estudo teve como objetivo caracterizar o fenótipo oral, incluindo parâmetros salivares, e o microbioma salivar de três irmãs com PLS, comparativamente. Duas delas já eram edêntulos, enquanto a mais nova possuía 15 dentes em cavidade oral.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Seleção de pacientes, avaliação clínica e radiográfica

Três irmãs, filhas de casamento consanguíneo e diagnosticadas com PLS foram selecionadas para este estudo. Características pré-intervenção incluíram periodontite avançada, hiperqueratose palmo-plantar e um longo histórico de tentativas de tratamento odontológico sem sucesso. As irmãs foram submetidas a exames clínicos, fotográficos e radiográficos. Duas irmãs perderam os dentes aproximadamente dois anos antes da seleção de pacientes para o estudo, com exceção dos terceiros molares impactados: PLSTL1 (paciente portadora de PLS desdentada 1) e PLSTL2 (paciente portadora da PLS desdentada 2). Uma irmã possuía 15 dentes na boca: PLST (paciente portadora de PLS dentada). As irmãs possuíam, 14, 16 e 18 anos no baseline do dia 03 de agosto de 2018, não fumantes, e não possuíam nenhuma outra condição sistêmica à parte da PLS. Depois da coleta da amostra de saliva, a PLST foi submetida à instrução de higiene oral. Um periodontista experiente tratou a paciente PLST com raspagem subgengival e alisamento radicular sob anestesia local. Foram feitas também tentativas com antibióticos locais, mas que não obtiveram sucesso. A técnica de profundidade de sondagem consistiu na medição de 4 pontos, para detecção das áreas de maior profundidade de penetração. A classificação quanto à doença periodontal foi estabelecida de acordo com o 2017 World Workshop of Periodontal and Peri-implant Disease and Conditions [22]. Reavaliações foram feitas um mês após e a cada três meses depois do início do estudo.

3.2.2 Características salivares

3.2.2.1. Fluxo e fiabilidade salivar

Amostras de saliva foram coletadas pela manhã no dia 3 de agosto de 2018. Os pacientes foram orientados a se abster de comer ou beber por 2h antes da coleta. Nenhuma das irmãs estava fazendo uso de antibiótico sistêmico ou local, ou submetida a tratamento periodontal por 9 meses prévios à coleta da saliva. O fluxo de saliva não estimulada foi realizado por coleta passiva de saliva, com a paciente sentada. A coleta ocorreu por 5 minutos. O volume de saliva foi medido (mL/min). A fiabilidade da saliva foi analisada durante a transferência da saliva ao microtubo. O fluxo de saliva estimulada foi realizado pela mastigação de um pedaço de dique de borracha (Madeitex, São José dos Campos – SP, Brasil) por 1 minuto. A saliva durante a estimulação foi descartada e, após o descarte, foram medidas por 5 minutos [23]. Para análise fenotípica, as amostras de saliva foram coletadas em três diferentes sessões, com intervalo de aproximadamente 1 ano. Nenhum tipo de medicação ou tratamento periodontal foi realizado 3 meses antes ou durante o período de coleta salivar. A classificação utilizada quanto à saliva em repouso foi: assialia (0.00mL/min), hipossalivação (0.5-0.9mL/min), hipossalivação leve (1.0-1.4mL/min), salivação ideal (1.5-2.5mL/min) e sialorréia (>2.5mL/min). Com relação à fiabilidade, a classificação foi serosa (não forma fio), fluida (fio de 2cm) ou viscosa (fio \geq 5cm).

3.2.2.2 pH Salivar e Capacidade Tampão

Um volume de 1mL de saliva estimulada foi transferida para um tubo de 1.5mL e o pH foi medido usando o método da fita (pH-Fix 0-14, Macherey-Nagel, Düren – NRW, Alemanha) por 30 segundos. Outro 1mL de saliva estimulada foi adicionado à 3mL de ácido hidrocloreídrico PA 37% [0.005 M] (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil) para avaliar a capacidade tampão, e o pH foi medido de novo após 2 minutos (mColorpHast MilliporeSigma, Burlington, MA, EUA).

3.2.2.3 Glicose salivar

A glicose salivar foi analisada usando o kit “Glucose Liquiform” (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santana, MG, Brasil). O estabilizador de glicose Glistab (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santana, MG, Brasil) foi adicionado à amostra de saliva não estimulada, na proporção de 30µL para cada 3mL de saliva. Após, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto, e 150µL de sobrenadante foi misturado com 500µL de reagente 1 (tampão fosfato 30mmol/L, pH7.5; fenol ≥1mmol/L; glicose oxidase ≥12500 U/L, peroxidases ≥800U/L; 4-aminoantipirina ≥ 290µmol / L; azida de sódio 7,5 mmol / L; e surfactantes). As amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos, e a absorbância foi medida a 505nm usando o espectrofotômetro Spectramax (Molecular Devices LCC, San Jose - CA, EUA). A glicose capilar (mg/dL) foi avaliada para fins comparativos com Accu-Check e tiras de teste (Roche, Basel, BS, Swiss).

3.2.2.4. Amilase Salivar

Este ensaio foi realizado usando um protocolo adaptado de teste de amilase (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santana, MG, Brasil). As amostras de saliva foram centrifugadas por 1 minuto a 20,000rpm, e o sobrenadante diluído 300 vezes com NaCl 0.85%. Após, 2µL das amostras de saliva preparadas foram adicionadas a 50µL de substrato 1 (0,4g/L de amido, pH 7,0; tampão fosfato e estabilizador), previamente incubado a 37 °C por 2min, e incubado por mais 7min e 30s a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 50µL do reagente de cor (iodato de potássio 16,7mmol/L; iodeto de potássio 271mmol/L e ácido clorídrico 112mmol/L) e 400µL de água destilada, após 5min em temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 660nm no espectrofotômetro Spectramax (Molecular Devices LCC, San Jose, CA, EUA).

3.2.3. Extração de DNA salivar, Sequenciamento de Amplicon e Bioinformática

O DNA foi extraído usando fenil-clorofórmio, conforme descrito com sucesso por Smalla *et al.* (1993) [24], para células procariotas. Após a extração de DNA, a PCR foi realizada para amplificação parcial do gene 16S rRNA usando os iniciadores universais 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') [25]. As condições de PCR foram as seguintes: 50µL de mistura, consistindo em 1,5mM de MgCl₂, 0,2µM de cada iniciador, 0,2mM de cada dNTP, 1U de Platinum Taq DNA polimerase, 1x tampão de reação de PCR e

aproximadamente 10ng de DNA genômico. Os ciclos de PCR foram uma etapa de desnaturação inicial a 95°C/3min; 25 ciclos, incluindo desnaturação a 95°C/30s; anelamento a 52°C/1 min e extensão a 72°C/1min mais uma etapa de extensão final a 72°C/7min. Os amplicons de PCR foram purificados usando Agencount AMPure Beads (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, EUA). A preparação da biblioteca foi realizada conforme descrito na Biblioteca de Fragmentos Ion Plus, a partir de uma quantidade inicial de 100ng de DNA e sequenciada no Sistema Ion PGM (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) usando um chip Ion 316, seguindo as instruções do fabricante. O conjunto de dados brutos está depositado no National Biotechnology Information Center (NCBI) sob o BioProject PRJNA558499. As leituras do gene 16S rRNA foram submetidas ao DADA2 versão 1.18 [26] na versão R 3.6.3 (R Core Team, 2021), para obter as variantes da sequência do amplicon (ASVs). As leituras foram filtradas, recuperando leituras com mais de 100bp e permitindo no máximo dois erros por leitura. As taxas de erro foram estimadas e as leituras foram desreplicadas para remover a redundância. As quimeras foram removidas e a taxonomia foi atribuída usando os bancos de dados Silva v.132 [27]. ASVs atribuídos a Eucariotos, cloroplastos ou mitocôndrias foram removidos usando phyloseq [28] antes de uma análise mais aprofundada.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Fenótipo oral

Em geral, as características fenotípicas observadas nas três pacientes foram perda óssea, perda precoce da dentição decídua e permanente, particularmente para as irmãs PLSTL (PLSTL1 e PLSTL2). O exame clínico da paciente que ainda possuía dente (PLST) revelou inflamação severa e hiperplasia (aumento) gengival, sangramento espontâneo, mobilidade dentária e bolsas periodontais profundas (Figuras 1A, 1B e 1C). A média da profundidade de sondagem da paciente PLST foi 8.82mm (± 3.46) e não regrediu com tratamentos prévios periodontais (Tabela 1). O exame radiográfico panorâmico da irmã PLST mostrou perda dos incisivos e primeiros molares permanentes. Os dentes remanescentes possuíam anatomia normal, no entanto, eles apresentavam uma aparência “flutuante” devido à perda de ligamento

periodontal e perda óssea (Figura 2). Os pais relataram que os primeiros sintomas para todas as irmãs se iniciaram na dentição decídua, com mobilidade dentária e sangramento gengival. De acordo com a nova classificação, a condição de PLST era periodontite como manifestação de doença sistêmica (CID-10 Q82.8) estágio IV, generalizada, grau C.

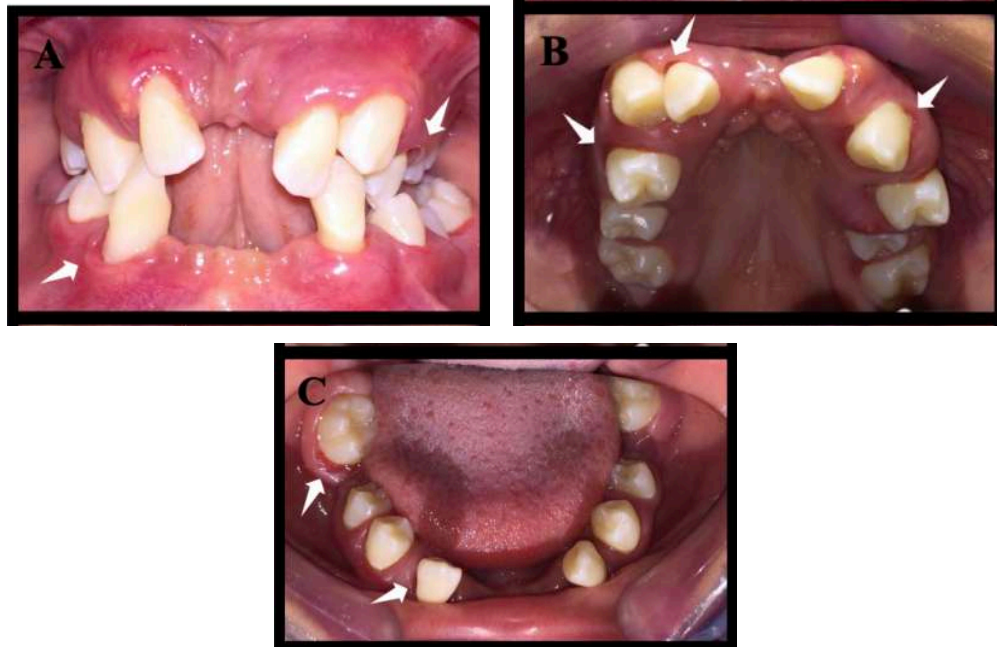


Figura 1 – Fotos intraoral da paciente PLST (paciente dentada). As setas indicam bolsas periodontais. É possível perceber uma perda significativa de dentes. Figura 1A: foto oclusal. Figura 1B: foto do arco superior. Figura 1C: foto do arco inferior.



Figura 2 – Panorâmica da paciente PLST (paciente dentada), mostrando perda óssea e aparência “flutuante” dos dentes.

3.3.2 Características salivares

A tabela 1 mostra as características sistêmicas e salivares das três irmãs portadoras da PLS: pH, capacidade tampão, amilase salivar e glicose. As pacientes com PLS apresentaram hipossalialia em fluxo salivar não estimulado. O fluxo salivar estimulado resultou hipossalivação em severa ou moderada. O pH da PLST foi: 6.97 ± 0.21 , PLSTL1: 7.1 ± 0.17 e PLSTL2: 6.7 ± 0.57 . A glicemia salivar da PLST foi 1.79 ± 2.50 mg/dL, PLSTL1 foi 10.11 ± 2.36 mg/dL e 1.26 ± 1.99 mg/dL para PLSTL2. A amilase salivar da PLST foi 11278.19 ± 2040.13 U/dL, enquanto para PLSTL1 foi 114008.15 ± 2422 U/dL e para PLSTL2 foi 16016.74 ± 2399.40 U/dL (Tabela 1).

Tabela 1 – Características dos indivíduos PLS e parâmetros salivares, pH, capacidade tampão, fiabilidade, fluxo salivar, atividade da amilase e glicose na síndrome de Papillon-Lefèvre

Indivíduo	PLST	PLSTL1	PLSTL2
Gênero	Feminino	Feminino	Feminino
Idade (anos)	14	18	16
Número de dentes erupcionados	15	Edentula	Edentula
Profundidade à sondagem (mm)	8.82 (± 3.46)	-	-
Não estimulada (mL/min)	0.35 (± 0.17) Ideal	0.21 (± 0.05) Hipossalialia	0.26 (± 0.06) Hipossalialia
Estimulada (mL/min)	0.73 (± 0.34) (Hipossalivação moderada)	0.51 (± 0.36) (Hipossalivação moderada)	0.26 (± 0.06) (Hipossalivação severa)
pH	6.97 (± 0.21)	7.1 (± 0.17)	6.7 (± 0.57)
Capacidade tampão	4.67 (± 1.15)	4.0 (± 1.0)	4.67 (± 1.15)
Fiabilidade	Serosa	Fluida	Fluida
Glicose (mg/dL)	1.79 (± 2.50)	10.11 (± 2.35)	1.26 (± 1.99)
Amilase (U/dL)	11278.19 (± 2040.13)	114008.15 (± 2422.31)	16016.74 (± 2399.40)
Glicose capilar (mg/dL)	96	106	92

3.3.3 Microbioma salivar

Ambos os domínios, *Bactéria* (90.16%) e *Archaea* (9.84%), estiveram presentes nas amostras. O microbioma salivar da PLS apresentou perfis diferentes ao nível dos filos, com proporções mais elevadas de *Fusobacteria* na irmã PLST, *Firmicutes* e *Proteobacteria* na irmã PLSTL1 e *Bacteroidetes* e *Firmicutes* na PLSTL2,

conforme mostrado na Figura 3. O heatmap (Figura 4) mostra as abundâncias relativas de gênero de táxons procarióticos. *Bacteroidales* F0058 (25.88%) e *Fusobacterium* (34.64%) dominaram o microbioma da irmã PLST. O microbioma da PLST também apresentou alta abundância de *Tannarella* (1.12%), *Treponema* (14%), *Campylobacter* (5.53%) e *Aggregatibacter* (4.61%). *Streptococcus* dominaram o microbioma da irmã PLSTL1, compreendendo 32% do microbioma total, com *Haemophilus* e *Caldivirga* em abundância relativa superior a 10%, enquanto PLSTL2 obteve maior abundância de *Lactobacillus* (8%) e *Porphyromonas* (3%). O domínio *Archaea* correspondeu a 10 táxons em nível de gênero, todos do filo *Crenoarchaeota* e *Halobacteriota*. O gênero *Caldivirga* (família *Thermoproteaceae*) e *Sulfophobococcus* (família *Desulfurococcaceae*) formaram a microbiota central de *Archaea* entre as irmãs PLS. A abundância relativa de *Caldivirga* foi 0.8% em PLST, 13.27% em PLSTL1 e 0.15% em PLSTL2. O diagrama de Venn (Figura 5) mostra que os microbiomas de PLSTL compartilham ASVs mais altos do que o PLST. Um microbioma central pode ser identificado, incluindo os organismos: *Prevotella*, *Fusobacterium* (alta abundância em todas as amostras, e dominante na irmã dentada), *Caldivirga* (família *Thermoproteaceae*, pertencente ao domínio *Archaea*, com alta abundância em PLSTL), *Streptococcus* (baixa abundância em PLST, 0.7%), *Oribacterium*, *Aggregatibacter*, *Dehalococcoidia* 1226B1H1-22-FL, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Campylobacter*, *Gemella*, *Sulfophobococcus* (*Archaea*), *Capnocytophaga* (ubiquidade, mas em baixa abundância) e *Peptococcus*.

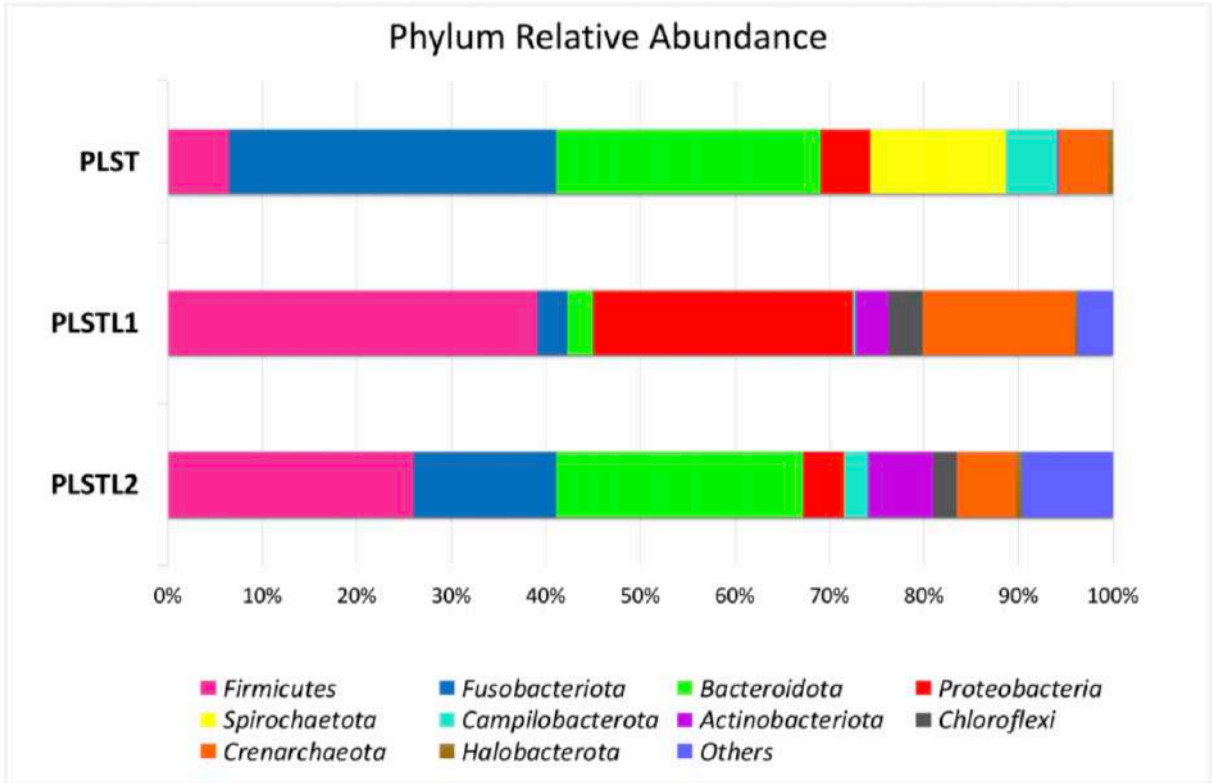


Figura 3 – Distribuição do filo no microbioma salivar nas irmãs com Síndrome de Papillon-Lefèvre.

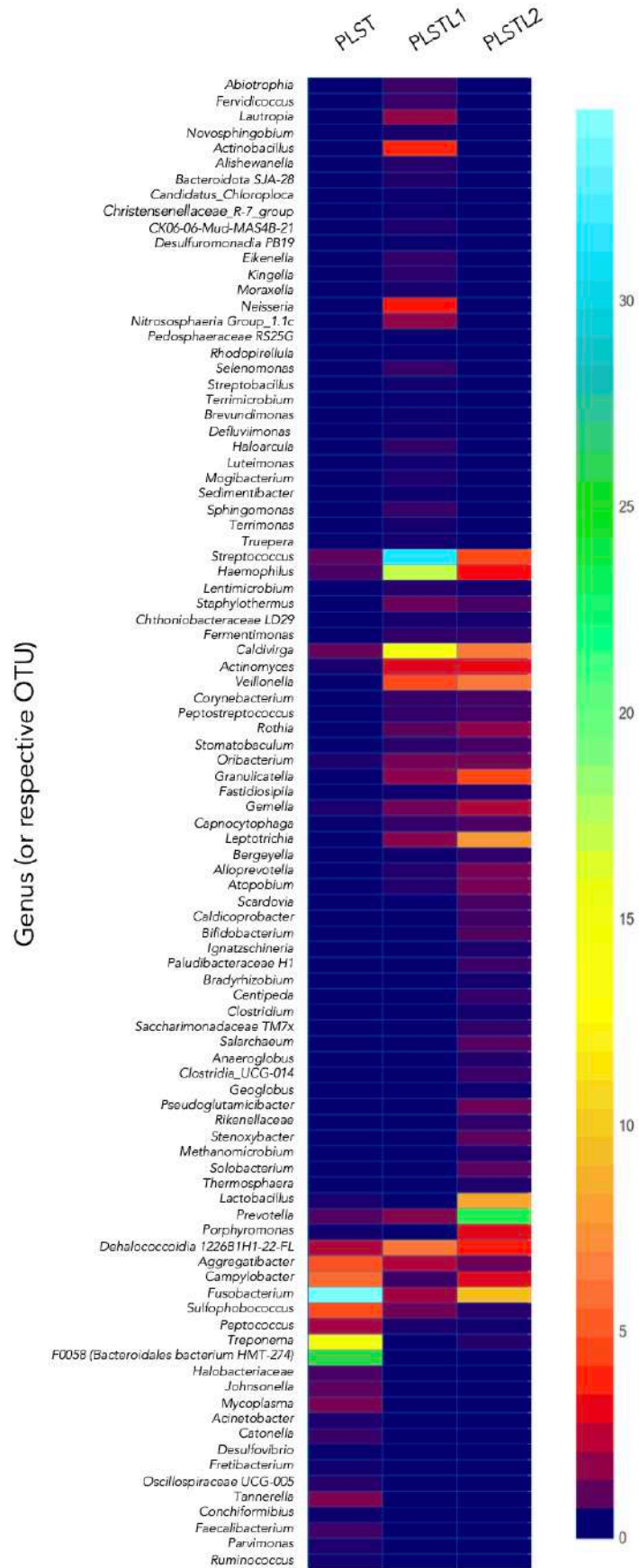


Figura 4 – Heatmap comparando gêneros nos três grupos. Papillon-Lefèvre dentada (PLST), Papillon-Lefèvre desdentada 1 (PLSTL1), Papillon-Lefèvre desdentada 2 (PLSTL2).

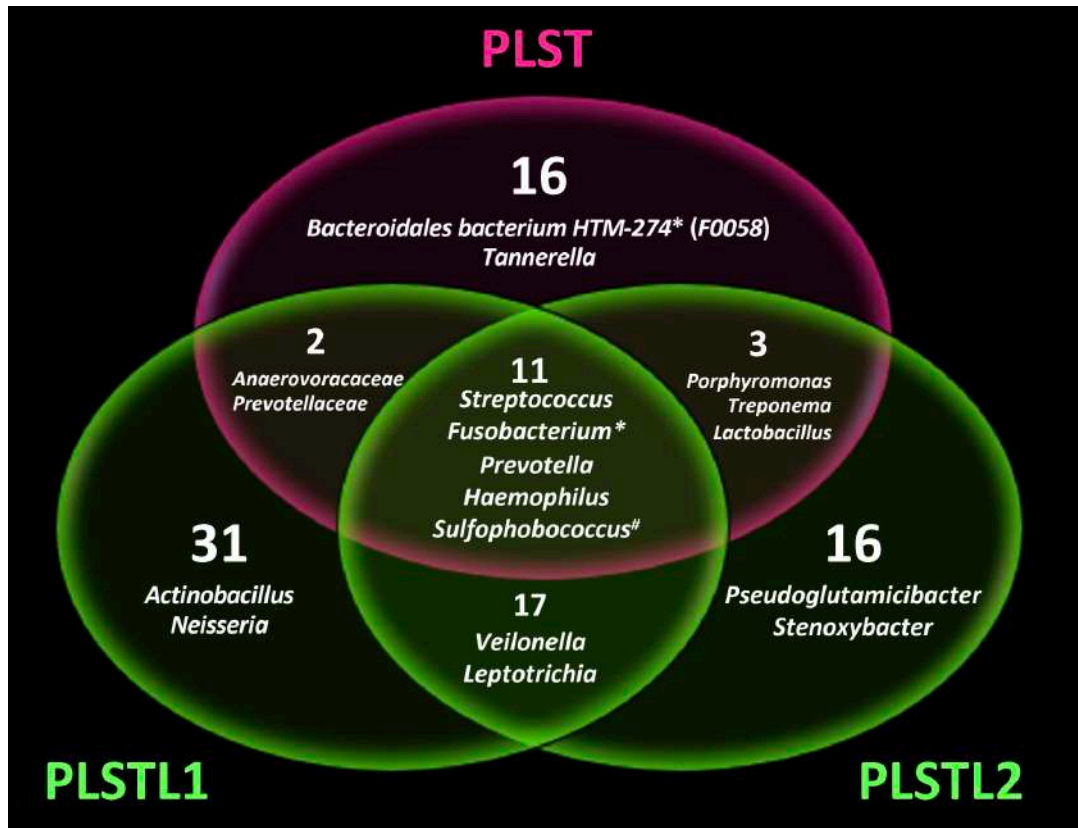


Figura 5 – Diagrama de Venn mostrando os gêneros da microbiota compartilhada na Síndrome de Papillon-Lefèvre, na paciente dentada (PLST) e nas irmãs desdentadas (PLSTL1 e PLSTL2). * Indica alta abundância na irmã PLST (>20%). # Indica a maior abundância do domínio *Archaea* em PLST.

3.4 DISCUSSÃO

O fenótipo oral dos indivíduos com PLS, neste estudo, seguiu o perfil da síndrome, com perda óssea e edentulismo precoce das irmãs mais velhas (PLSTL1 e PLSTL2). Todas tiveram hiperkeratose palmo-plantar também. A PLST (irmã mais nova) apresentou mobilidade dentária, perda óssea, bolsas periodontais profundas, gengiva inflamada e dificuldade em se alimentar. A avaliação da profundidade de sondagem era complexa no indivíduo PLST devido ao sangramento espontâneo gengival, hiperplasia gengival, intensa mobilidade dental e pela pouca idade da paciente. As tentativas para tratar a doença periodontal com métodos convencionais em pacientes com PLS são frustradas na maioria dos casos, como foi o caso dessas irmãs. Este estudo mostra diferenças no microbioma salivar entre PLST e PLSTL (PLSTL1 e PLSTL2). Pela primeira vez, foram detectadas alta abundância relativa de bactérias não cultivadas, *Bacteroidales* F0058, *Caldivirga* e *Sulfobococcus* (os últimos

dois do domínio *Archaea*), o que foi possível devido ao método de sequenciamento *next-generation* (NGS).

A caracterização salivar mostrou que os pacientes PLS possuem pH, capacidade tampão e fiabilidade normais. As três pacientes PLS apresentaram severa e moderada hipossalivação e PLSTL1 e PLSTL2 possuem hipossalialia. Esses achados sugerem que hipossalivação possivelmente é uma característica da síndrome, que nunca foi descrita previamente na literatura. Mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese, uma vez que a hipossalivação está associada a um maior risco de infecções orais [29,30]. Hipofunção salivar pode ter um papel importante na mudança de dieta, resultando em má nutrição e/ou perda de peso, afetando na qualidade de vida [30]. É fundamental destacar que a saliva possui um papel essencial na manutenção de um microbiota equilibrada [30] e promovendo saúde bucal [21]. Curiosamente, o nível de glicose salivar encontrado em PLSTL1 foi alto. O microbioma salivar encontrou-se alterado na presença de alta concentração de glicose salivar, demonstrando um decréscimo na carga bacteriana [31]. No estudo de Goodson *et al.* (2017), a ordem na redução do microbioma foi na direção da força acidúrica das espécies bacterianas, com *Prevotella spp.* sendo mais sensível e *Streptococcus mutans* entre os mais resistentes. A abundância relativa de *Streptococcus* e *Prevotella* nas amostras salivares de PLSTL1 e PLSTL2 seguiu um perfil similar em nosso estudo. *Streptococcus* dominou o microbioma de PLSTL1 (glicose salivar >10mg/dL) e *Prevotella* dominou o microbioma de PLSTL2 (glicose salivar <2mg/dL). Uma alta abundância de *Streptococcus*, *Treponema* e *Campylobacter* em biofilme dental de indivíduos PLS foram descritos por Albandar *et al.* (2012), usando clonagem de DNA ribossomal 16S e o HOMIM (Human Oral Microbe Identification Microarray). No entanto, nossos resultados mostraram menos *Streptococcus* na amostra PLST usando um método NGS. Albandar *et al.* (2012) usaram um método de clonagem, o que leva à perda de diversidade, principalmente para microorganismos não cultivados. Devido às diferenças metodológicas, podemos descrever melhor a abundância de outros gêneros que deveriam estar envolvidos na disbiose da PLS. Apesar da alta abundância relativa de *Firmicutes* acidogênicos, o pH da saliva de PLST1 e PLST2 foi neutro. A média da concentração da amilase salivar nas amostras de PLSTL2 foi de 16016.74 ±2399.40U/dL, enquanto a concentração de amilase de PLSTL1 e PLST foi de aproximadamente 11000U/dL. Um estudo interessante demonstrou que o número de cópias do gene *AMY* da amilase salivar estava correlacionado com a composição

e função do microbioma oral e intestinal [32]. A amilase é uma enzima salivar essencial que hidrolisa ligações alfa do amido e do glicogênio, iniciando a degradação do amido na boca. De acordo com os autores, os microbiomas de indivíduos com poucas cópias de AMY1 (AMY1 L) tinham maior capacidade de quebrar carboidratos complexos. Indivíduos com alto número de cópias AMY1 (AMY1 H) apresentaram maior abundância de *Porphyromonas* na saliva. Sua microbiota intestinal tinha abundância aumentada de micróbios resistentes degradadores de amido. As OTUs que discriminaram significativamente os grupos AMY1 H e AMY1 L pertenciam aos gêneros *Prevotella* (AMY1 H), *Haemophilus* (AMY1 L), *Neisseria* (AMY1 L) e *Porphyromonas* (AMY1 H). Neste estudo, PLSTL2 apresentou maior abundância de *Prevotella* (23.56%) e *Porphyromonas* (2.68%), quando comparado com as outras irmãs, o que corrobora a hipótese de AMY H de Poole *et al.* (2019). *Neisseria* foi encontrada apenas nas amostras de PLSTL1 (3.28%) e *Haemophilus* teve uma abundância relativa maior em PLSTL1 (17.12%) quando comparado às amostras das outras irmãs PLS. A atividade e concentração da amilase não parecem ser afetadas pela deleção da catepsina C em camundongos (CTSC - / -) e nem na catepsina C co-localizada nos compartimentos secretores de zimogênio [16]. Portanto, a concentração elevada da amilase em PLSTL2 é provavelmente uma observação isolada e sem relação com uma mutação da catepsina C em PLS, mas que merece análise, pois pode afetar o microbioma. É fundamental destacar a alta abundância de *Granulicatella* e *Veillonella* nas irmãs PLSTL. Esses gêneros fazem parte do microbioma especializado da mucosa oral. Comparando as irmãs PLSTL com a irmã PLST, devem ser levadas em consideração as diferenças observadas no microbioma da saliva da PLST, que está fortemente relacionado com a presença das superfícies dos dentes como suporte físico para a fixação das placas supra e subgingivais. As alterações microbianas da saliva após a perda dentária das pacientes PLS são esperadas, uma vez que representam a perda da superfície de aderência da placa bacteriana [18,33,34]. Socransky *et al.* (2005) mostraram que, em geral, o perfil microbiano era mais similar entre indivíduos saudáveis e com periodontite do que entre indivíduos edêntulos. De acordo com Zaura *et al.* (2009) [35], as comunidades obtidas em amostras de saliva são mais parecidas com as comunidades da mucosa do que dos sítios dentais. Na perda dentária ocorrem alterações na cavidade oral que resultam na perda da taxa bacteriana nos tecidos moles [34]. O biofilme formado no

dente se desenvolve rapidamente e tem uma proporção mais significativa de espécies do que os indivíduos edêntulos [36].

Os indivíduos com PLS desse estudo possuem uma predisposição genética de uma catepsina C ineficaz que levou à inflamação e estágio IV de periodontite, que se adequa ao modelo IMPEDE (Inflammation-Mediated Polymicrobial-Emergence and Dysbiotic-Exacerbation) [37]. O processo de inflamação da periodontite pode desencadear a disbiose, e a própria disbiose aumenta a resposta inflamatória [37]. A teoria da disbiose na periodontite está relacionada à transição da comunidade microbiológica de comensal Gram-positiva para uma comunidade inflamatória enriquecida de Gram-negativa. Curiosamente, *Bacteroidales* F0058 (clone AU126, OT274 ou HOT274), presumivelmente uma bactéria Gram-negativa, dominou massivamente o microbioma da irmã PLST como um ASV exclusivo relacionado à presença de dentes, sem leituras em microbiomas de PLSTL. Na coorte do Projeto Microbioma Humano (HMP), de 210 adultos, o *Bacteroidales* F0058 (provisoriamente designado como *Bacteroidales Neisseriaceae* [G-1] *bacterium* HMT-274) era comum em narinas de adultos [38]. A investigação de Kumar *et al.* (2003) [39] de potenciais patógenos periodontais em 66 indivíduos mostrou que a *Bacteroidales bacterium* HMT-274 estava entre as mais fortemente associadas à periodontite anteriormente conhecida como crônica, comparável ou mais significativa do que as espécies *P.gingivalis* e *T. forsythia*. A prevalência de *Bacteroidales bacterium* HMT-274 estava significativamente alta na população do estudo com periodontite (82%). Li *et al.* (2006) [40] encontraram também uma alta prevalência de *Bacteroidales bacterium* HMT-274 em placa subgengival de periodontite crônica (77.1%), como era classificada anteriormente, e em gengivite induzida por placa (61.5%). A *Bacteroidales bacterium* HMT-274, bactéria ainda não cultivada, não tem potenciais parceiros de crescimento descritos. Escapa *et al.* (2018), em sua análise ANCOM, detectou apenas o taxón específico do grupo e nenhuma outra espécie com abundância relativa diferencial relacionada à *Bacteroidales bacterium* HMT-27. Entretanto, de acordo com Oliveira *et al.* (2016) [41], a nova espécie *Bacteroidales bacterium* HMT-27 não é uma consequência da periodontite, mas provavelmente possui um papel crucial no início da doença.

Outro resultado marcante de nosso estudo foi a presença do domínio Archaea, correspondendo a 24 ASVs e 10 táxons em nível de gênero, todos do filo *Crenoarchaeota* e *Halobacteriota*. A *Haloarcula* foi recentemente descoberta como

parte da microbiota do trato gastrointestinal [42]. Nosso estudo é o primeiro a reportar a presença de alta abundância de *Archaea* no microbioma salivar humano. Embora a maior parte da *Archaea* metanogênica tenha sido detectada na cavidade oral até agora [43] e outros sinais de presença de *Archaea* em amostras orais foram associadas à contaminação das amostras, a alta abundância de *Caldivirga* e *Sulfophobococcus* representa evidência da importância desses organismos (ou seus relacionado taxonômicos), provavelmente associados a sítios disbióticos. *Crenarchaeota* já foi detectada em amostras fecais humanas, sugerindo sua presença na microbiota do ecossistema digestivo humano [44]. Nas amostras salivares das irmãs PLS ambos os gêneros, *Caldivirga* (família *Thermoproteaceae*) e *Sulfophobococcus* (família *Desulfurococcaceae*) constituíram o microbioma central, variando de 0,8% a 13% de abundância relativa. Alguns estudos explicaram parte do papel indireto/direto da *Archaea* na inflamação de sítios específicos e o potencial pró-inflamatório de algumas espécies [45]. Quando ocorre uma disbiose ou infecção, vários locais do corpo são conhecidos por conter uma alta prevalência de *Archaea*, especialmente a pele e a cavidade oral. Em uma periodontite grave, foi demonstrado que uma mudança para bactérias fermentativas anaeróbicas está acompanhada de um aumento de *Archaea* [46]. O indivíduo PLST apresentou mais de 5% de abundância relativa de *Crenarchaeota* (4,45% *Sulfophobococcus* e 0,8% *Caldivirga*). PLSTL1 e PLSTL2 apresentaram 0,95% e 0,15% de *Sulfophobococcus*, enquanto a abundância de *Caldivirga* foi de 13,27% e 6,15%, respectivamente. Esse resultado também sugere que uma disbiose relacionada ao arqueoma na PLS muda com edentulismo. Nosso resultado pode refletir os avanços nas sequências de *Archaea* no banco de dados e no primer universal com boa cobertura para seu domínio. Acreditamos que o arqueoma oral será fácil de caracterizar no futuro.

Os táxons de redução de sulfato dissimilatórios e assimilatórios dominaram o microbioma central de *Bacteria* e *Archaea* na PLS, e eram bastante abundantes em PLST [47]. *Desulfurococcales*, *Sulfophobococcus* são anaeróbicos acidofílicos que fermentam açúcares e peptídios, utilizando compostos orgânicos para reduzir o enxofre e gerar sulfeto de hidrogênio (H_2S), ácidos orgânicos e álcoois [48]. O H_2S do metabolismo da *Archaea* pode servir como doador de elétrons para uma diversidade de microrganismos aeróbios quimiotróficos e anoxigênicos, formando comunidades microbiológicas em habitats sulfídicos [49]. As bactérias redutoras de sulfato tendem a prevalecer em bolsas com sangramento à sondagem, e sua presença está

significativamente correlacionada com a profundidade da bolsa [46,50]. Possivelmente, *Sulfophobococcus* e *Caldivirga* possuem uma correlação semelhante na PLS e desenvolvem um papel essencial na coagregação para formação de uma placa subgingival agressiva. *Archaea* pode participar, indiretamente, na doença periodontal servindo de reservatório de hidrogênio, facilitando a proliferação de fermentadores secundários patogênicos para níveis além daquele em sua ausência [46]. Conseqüentemente, *Archaea* pode ter contribuído para um ambiente favorável para as bactérias redutoras de sulfato na PLST. *Staphylococcus aureus*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* são bactérias redutoras de sulfato [51]. *Fusobacterium* dominou o microbioma de PLST (34,64%), consistente com um habitat sulfídico e com um papel crucial desta bactéria na estrutura e ecologia do biofilme oral. *Fusobacterium nucleatum*, por exemplo, foi encontrado atuando como uma ponte entre colonizadores do biofilme periodontal inicial e tardio [52]. Além disso, *Fusobacterium nucleatum* desencadeia a produção de matriz de metaloproteínases pelo hospedeiro, tem atividade hemolítica aumentada e a produção de H₂S é uma característica chave de virulência desta bactéria na periodontite [52].

Descobriu-se que o *Fusobacterium nucleatum*, por exemplo, atua como uma ponte entre os colonizadores de biofilmes periodontais precoces e tardios [52]. Além disso, *Fusobacterium nucleatum* desencadeia a produção de metaloproteínases de matriz pelo hospedeiro, tem atividade hemolítica aumentada e a produção de H₂S é uma característica de virulência chave desta bactéria na periodontite [52]. Membros do gênero *Treponema* também são capazes de homoacetogênese (processo de consumo de hidrogênio), incluindo o patógeno da periodontite, *Treponema denticola*. A PLST apresentou alta abundância de *Treponema* (14%), *Tannarella* (1,12%) e *Campylobacter* (5,53%), frequentemente enriquecido no microbioma associado à periodontite [18,53]. Esses resultados suportam a hipótese de uma possível interação sintrófica entre *Archaea*, *Treponema* e outros membros do complexo vermelho [46] em uma comunidade gengival altamente inflamatória.

Ao longo dos anos, as interações entre a microbiota e a resposta do hospedeiro como o agente causal inicial da periodontite tornaram-se mais evidentes. Entretanto, a mudança patológica de periodontite localizada e contida para a progressiva e destrutiva ainda não foi esclarecida [37, 54]. O desenvolvimento da destruição agressiva do periodonto nos indivíduos PLS pode ser um modelo para entender como a genética, as citocinas, os fatores imunológicos e o microbioma interagem para os

resultados da periodontite. Na PLS, o distúrbio genético da cetapsina C (CTSC) veio primeiro e levou à disbiose nos indivíduos deste estudo. Em conjunto com a literatura prévia e nossos achados, formulamos a hipótese de uma biogeografia microbiológica subgingival em PLST que começa com a erupção dos dentes (figura 6). Assim que os dentes começam a irromper na arcada dentária do indivíduo PLST, a película salivar cobre-os fornecendo suporte de fixação e substrato para os microrganismos comensais. Por conseguinte, alguns microrganismos que compõem a biogeografia do biofilme em escala micron, conforme proposto por Welch (2020) [55]; *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Capnocytophaga* e *Fusobacterium* podem colonizar a superfície do dente (Figura 6). O sistema imunológico debilitado não pode fornecer a primeira linha de defesa celular devido a uma catepsina C ineficaz. A elastase de neutrófilos (NE) não está ativa ou reduzida, impossibilitando a infiltração de neutrófilos nos tecidos adjacentes, prejudicando a fagocitose, citemas e a formação de NETs [16]. A falta de defesa dos neutrófilos pode reduzir o controle da carga microbiana, permitindo um acúmulo massivo de biofilme (Figura 6). Os primeiros colonizadores proliferam, diminuindo o nível de O₂. O ambiente é altamente favorável à coadesão e coagregação de outros microrganismos, alterando de aeróbios Gram-positivos para anaeróbios Gram-negativos [56]. Por exemplo, *Fusobacterium*, que domina abundantemente o microbioma de PLST, cria uma camada anóxica e dita a estrutura e a ecologia do biofilme [55]. Já a *Fusobacterium nucleatum* cresce mais em ambiente sulfídrico e se mostrou um alto produtor de sulfeto de hidrogênio (H₂S) [52]. A mesma característica se aplica a outro produtor de H₂S, a archaea *Sulfophobococcus* [49]. Anaeróbios que usam sulfato como aceitador terminal de elétrons para anaerobiose no processo de redução dissimilatória de enxofre (DRS) e compostos orgânicos como fonte de energia encontram um habitat sulfídrico perfeito [51,52]. As condições ambientais, a sinergia e a competição microbiana, em conjunto, favorecem a proliferação de outros microrganismos Gram-negativos e anaeróbios como *Archaea*, *Treponema*, *Bacteroidales* F0058, *Tannerella* e *Porphyromonas*, mimetizando um consórcio de periodontite formal agressivo em PLST (Figura 6).

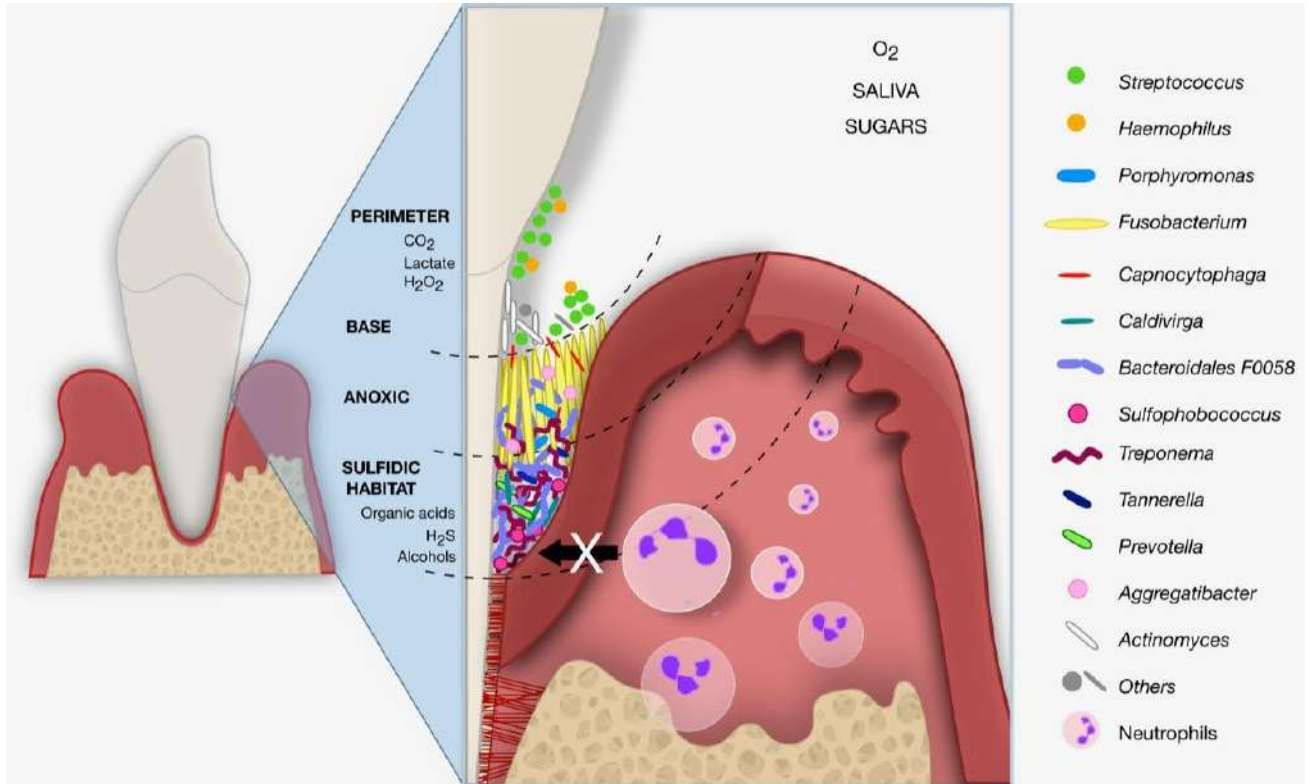


Figura 6 – Biogeografia de microbioma subgengival hipotética de PLST. Os dentes recém erupcionados servem como suporte de fixação para comensais onipresentes que formam uma película inicial (*Streptococcus* e *Actinomyces*). A infiltração de neutrófilos e a primeira linha de defesa são prejudicadas devido a uma catepsina C ineficaz. Os micróbios aeróbicos aderidos servem então como substrato para outros colonizadores. *Fusobacterium*, também uma bactéria onipresente, desempenha um papel crucial como ponte entre o primeiro e o último colonizador. *Fusobacterium* produz sulfato de hidrogênio (H_2S), cresce e cria um habitat sulfídico ideal para anaeróbicos como *Treponema*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Sulfophobococcus*, *Caldivirga* e *Bacteroidales F0058*. A imagem esquemática representa uma hipótese para PLST e foi inspirada por Mark Welch et al. (2020).

3.5 CONCLUSÕES

Este estudo sugere que a resposta do hospedeiro e o microbioma residente estão associados a um desequilíbrio bidirecional entre saúde e doença na PLS. O indivíduo PLST tem uma microbiota diferente da reconhecida previamente na periodontite mais agressiva. Um microbioma possivelmente favorecido por um habitat sulfídico, capaz de resistir ao tratamento convencional periodontal e à terapia antibiótica. Todas as consequências de um ambiente onde neutrófilos e seus mecanismos de defesa da linha de frente são inexistentes ou substancialmente reduzidos. O fenótipo da Síndrome de Papillon-Lefèvre destaca a disbiose do

microbioma e o papel fundamental que os neutrófilos possuem na manutenção da saúde oral e cutânea. Considerando a alta abundância relativa na PLST, os gêneros *Fusobacterium*, *Treponema*, *Tannerella* e *Sulfophobococcus* são possíveis candidatos a formar um consórcio com a *Bacteroidales* F0058; esta é uma hipótese que merece investigação futura. É inegável que o arqueoma é onipresente no microbioma salivar e mais complexo do que se pensava. O conhecimento sobre o microbioma na PLS é excepcionalmente relevante na busca por tratamentos específicos de sucesso.

3.6 REFERÊNCIAS

1. Papillon M, Lefevre P. Two cases of symmetrically familial palmar and plantar hyperkeratosis (Meleda disease) within brother and sister combined with severe dental alterations in both cases. *Bull Soc Fr Dermatol Syphiligr.* 1924;31(2):82-7.
2. Hart TC, Shapira L. Papillon-Lefèvre syndrome. *Periodontology* 2000. 1994;6(1):88-100.
3. Bhavsar MV, Brahmbhatt NA, Sahayata VN, Bhavsar NV. Papillon-lefevre syndrome: Case series and review of literature. *Journal of Indian Society of Periodontology.* 2013;17(6):806.
4. Bullón P, Castejón-Vega B, Román-Malo L, Jimenez-Guerrero MP, Cotán D, Forbes-Hernandez TY, et al. Autophagic dysfunction in patients with Papillon-Lefevre syndrome is restored by recombinant cathepsin C treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2018;142(4):1131-43. e7.
5. AlBarrak ZM, Alqarni AS, Chalisserry EP, Anil S. Papillon–Lefèvre syndrome: a series of five cases among siblings. *Journal of medical case reports.* 2016;10(1):260.
6. Jordan RC. Diagnosis of periodontal manifestations of systemic diseases. *Periodontology* 2000. 2004;34(1):217-29.
7. Robertson K, Drucker D, James J, Blinkhorn A, Hamlet S, Bird P. A microbiological study of Papillon-Lefevre syndrome in two patients. *Journal of clinical pathology.* 2001;54(5):371-6.

8. Tumen DS, Tumen EC, Gunay A, Lacin N, Cetin SG. The typical appearance and CBCT images of the patient with papillon-lefevre syndrome: a case report. *Journal of International Dental and Medical Research*. 2015;8(3):128.
9. Hattab FN. *Papillon-Lefèvre syndrome: from then until now*. 2019.
10. Fischer J, Blanchet-Bardon C, Prud'homme J-F, Pavek S, Steijlen PM, Dubertret L, et al. Mapping of Papillon-Lefevre syndrome to the chromosome 11q14 region. *European Journal of Human Genetics*. 1997;5:156-60.
11. Toomes C, James J, Wood AJ, Wu CL, McCormick D, Lench N, et al. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nature genetics*. 1999;23(4):421-4.
12. Hart TC, Hart PS, Bowden DW, Michalec MD, Callison SA, Walker SJ, et al. Mutations of the cathepsin C gene are responsible for Papillon-Lefevre syndrome. *Journal of medical genetics*. 1999;36(12):881-7.
13. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *The Journal of Immunology*. 2012;189(6):2689-95.
14. Roberts H, White P, Dias I, McKaig S, Veeramachaneni R, Thakker N, et al. Characterization of neutrophil function in Papillon-Lefèvre syndrome. *Journal of leukocyte biology*. 2016;100(2):433-44.
15. Sørensen OE, Clemmensen SN, Dahl SL, Østergaard O, Heegaard NH, Glenthøj A, et al. Papillon-Lefevre syndrome patient reveals species-dependent requirements for neutrophil defenses. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(10):4539-48.
16. John DS, Aschenbach J, Krüger B, Sandler M, Weiss FU, Mayerle J, et al. Deficiency of cathepsin C ameliorates severity of acute pancreatitis by reduction of neutrophil elastase activation and cleavage of E-cadherin. *Journal of Biological Chemistry*. 2019;294(2):697-707.
17. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu W-H, et al. The human oral microbiome. *Journal of bacteriology*. 2010;192(19):5002-17.
18. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005;38(1):135-87.

19. Albandar JM, Khattab R, Monem F, Barbuto SM, Paster BJ. The subgingival microbiota of Papillon-Lefèvre syndrome. *Journal of periodontology*. 2012;83(7):902-8.
20. Hoare A, Marsh PD, Diaz PI. Ecological therapeutic opportunities for oral diseases. *Bugs as Drugs: Therapeutic Microbes for the Prevention and Treatment of Disease*. 2018:235-65.
21. Kilian M, Chapple I, Hannig M, Marsh P, Meuric V, Pedersen A, et al. The oral microbiome—an update for oral healthcare professionals. *British dental journal*. 2016;221(10):657-66.
22. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of periodontology*. 2018;89:S1-S8.
23. Navazesh M, Kumar SK. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *The Journal of the American Dental Association*. 2008;139:35S-40S.
24. Smalla K, Cresswell N, Mendonca-Hagler LC, Wolters A, Elsas Jv. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993;74(1):78-85.
25. Bates ST, Berg-Lyons D, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *The ISME journal*. 2011;5(5):908-17.
26. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*. 2016;13(7):581-3.
27. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*. 2012;41(D1):D590-D6.
28. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*. 2013;8(4):e61217.

29. Shimomura-Kuroki J, Nashida T, Miyagawa Y, Morita T, Hayashi-Sakai S. Analysis of salivary factors related to the oral health status in children. *Journal of Oral Science*. 2020;62(2):226-30.
30. Pedersen AML, Sørensen CE, Proctor G, Carpenter G, Ekström J. Salivary secretion in health and disease. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2018;45(9):730-46.
31. Goodson JM, Hartman M-L, Shi P, Hasturk H, Yaskell T, Vargas J, et al. The salivary microbiome is altered in the presence of a high salivary glucose concentration. *PloS one*. 2017;12(3):e0170437.
32. Poole AC, Goodrich JK, Youngblut ND, Luque GG, Raud A, Sutter JL, et al. Human salivary amylase gene copy number impacts oral and gut microbiomes. *Cell host & microbe*. 2019;25(4):553-64. e7.
33. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(11):5721-32.
34. Gazdeck RK, Fruscione SR, Adami GR, Zhou Y, Cooper LF, Schwartz JL. Diversity of the oral microbiome between dentate and edentulous individuals. *Oral diseases*. 2019;25(3):911-8.
35. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy" core microbiome" of oral microbial communities. *BMC microbiology*. 2009;9(1):1-12.
36. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, et al. The oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural dentition. *PloS one*. 2015;10(9):e0137717.
37. Van Dyke TE, Bartold PM, Reynolds EC. The nexus between periodontal inflammation and dysbiosis. *Frontiers in immunology*. 2020;11.
38. Escapa IF, Chen T, Huang Y, Gajare P, Dewhirst FE, Lemon KP. New insights into human nostril microbiome from the expanded human oral microbiome database (eHOMD): a resource for the microbiome of the human aerodigestive tract. *Msystems*. 2018;3(6).

39. Kumar P, Griffen A, Barton J, Paster B, Moeschberger M, Leys E. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *Journal of dental research*. 2003;82(5):338-44.
40. Li C, Liang J, Jiang Y. Association of uncultivated oral phylotypes AU126 and X112 with periodontitis. *Oral Diseases*. 2006;12(4):371-4.
41. Oliveira R, Fermiano D, Feres M, Figueiredo L, Teles F, Soares G, et al. Levels of candidate periodontal pathogens in subgingival biofilm. *Journal of dental research*. 2016;95(6):711-8.
42. Kim JY, Whon TW, Lim MY, Kim YB, Kim N, Kwon M-S, et al. The human gut archaeome: identification of diverse haloarchaea in Korean subjects. *Microbiome*. 2020;8(1):1-17.
43. Belmok A, de Cena J, Kyaw C, Damé-Teixeira N. The oral archaeome: a scoping review. *Journal of dental research*. 2020;99(6):630-43.
44. Rieu-Lesme F, Delbès C, Sollelis L. Recovery of partial 16S rDNA sequences suggests the presence of Crenarchaeota in the human digestive ecosystem. *Current microbiology*. 2005;51(5):317-21.
45. Borrel G, Brugère J-F, Gribaldo S, Schmitz RA, Moissl-Eichinger C. The host-associated archaeome. *Nature Reviews Microbiology*. 2020;18(11):622-36.
46. Dabdoub SM, Ganesan SM, Kumar PS. Comparative metagenomics reveals taxonomically idiosyncratic yet functionally congruent communities in periodontitis. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-13.
47. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*. 2000;28(1):27-30.
48. DasSarma, S., Coker, J. A., DasSarma, P. (2009). "Archaea (overview)", in *Encyclopedia of Microbio*
49. Blohs, M., Moissl-Eichinger, C., Mahnert, Spang, A., Dombrowski, N., Krupovic, M., Klingl, A. (2019). "Archaea – An Introduction", in *Encyclopedia of Microbiology (fourth edition)*, ed. T. M. Schmidt (Cambridge, MA:Academic Press), 243-252.

50. Langendijk P, Hanssen J, Van der Hoeven J. Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2000;27(12):943-50.
51. Kushkevych I, Cejnar J, Tremel J, Dordević D, Kollar P, Vítězová M. Recent advances in metabolic pathways of sulfate reduction in intestinal bacteria. *Cells*. 2020;9(3):698.
52. Thurnheer T, Karygianni L, Flury M, Belibasakis GN. *Fusobacterium* species and subspecies differentially affect the composition and architecture of supra-and subgingival biofilms models. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:1716.
53. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(10):717-25.
54. Bartold PM, Van Dyke TE. An appraisal of the role of specific bacteria in the initial pathogenesis of periodontitis. *Wiley Online Library*; 2019.
55. Welch JLM, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(6):E791-E800.
56. Kirst ME, Li EC, Alfant B, Chi Y-Y, Walker C, Magnusson I, et al. Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis. *Applied and environmental microbiology*. 2015;81(2):783-93.

CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

4.1 DISCUSSÃO GERAL

Os indivíduos deste estudo seguiram o perfil fenotípico da Síndrome de Papillon-Lefèvre descrito anteriormente; hiperkeratose palmo-plantar, doença periodontal, perda óssea, perda precoce da dentição decídua e permanente, mobilidade dentária, bolsas periodontais profundas, gengiva inflamada, dificuldade para se alimentar e, muitas vezes, de socialização. As avaliações clínicas desses pacientes podem ser complexas de serem realizadas, devido ao sangramento espontâneo gengival, intensa mobilidade dentária e a pouca idade do início dos sintomas, que começam por volta dos 2-4 anos de idade. Os métodos convencionais para tratamento da doença periodontal não são eficazes nesses casos, como aconteceu no caso dessas três irmãs.

No estudo de Hart *et al.* (1999) [1], eles responsabilizam uma mutação no gene da Catepsina C (CTSC) pela síndrome, mas é provável que outros fatores também colaborem pelo fenótipo, uma vez que existem diferenças na severidade da condição dentro da mesma família [2] e por uma outra condição ter a mesma mutação em homocigoto, mas que possui algumas características fenotípicas diferentes, conhecida como síndrome de Haim-Munk [3]. A quase perda completa da atividade da CTSC é necessária para que ocorra o fenótipo da PLS.

Os níveis de IL-3, TNF- α e VIM encontram-se mais elevados no paciente PLS avaliado, o que indica que uma alteração inflamatória relacionada a esses marcadores pode influenciar em um possível mecanismo de compensação da resposta imune nesse paciente. Um valor elevado das citocinas também pode ser justificado pela alta susceptibilidade a infecções que esses pacientes possuem e pela perda precoce de dentes devido à doença periodontal. Uma hipótese sugerida por Sadik *et al.* (2012) [4] é que em pacientes com PLS os leucócitos PMNs produzem mais citocinas pró-inflamatórias para compensar sua capacidade reduzida de neutralizar leucotoxinas e eliminar bactérias, porém, esse resultado não obteve significância estatística devido à amostra ser pequena e heterogênea quanto à idade e etnia.

Por muitos anos, a causa subjacente da periodontite em pacientes com PLS foi ocorria, segundo Korkmaz *et al.* (2018) [5], devido à falha dos sistemas de peptídeos antimicrobianos dos hospedeiros para eliminar bactérias consideradas patogênicas.

No entanto, estudos abrangendo o impacto da deficiência da Catepsina C revelaram outros eventos mais complexos, que se interligam e implicam na disfunção de neutrófilos na destruição de tecidos em locais com desafio bacteriano [6]. Dessa maneira, acredita-se que os defeitos manifestados nos neutrófilos da PLS surgem de uma exposição crônica a um estímulo microbiano na região dos dentes, permitindo a persistência de patógenos bacterianos específicos e sua contínua estimulação de resposta imunoinflamatórias ineficazes nos tecidos periodontais, o que pode explicar a destruição de tecidos em áreas onde os neutrófilos são as células imunológicas dominantes [5]. Então, dessa forma, os patógenos provavelmente desencadeiam dano indireto ao tecido mediado pela disfunção de neutrófilos [5].

O processo inflamatório da periodontite pode desencadear uma disbiose, que de forma bidirecional pode aumentar a resposta inflamatória [7]. A teoria da disbiose na periodontite está relacionada à transição da comunidade de Gram-positiva para uma comunidade inflamatória de Gram-negativa. Curiosamente a *Bacteroidales* F0058 uma Gram-negativa e que dominou o microbioma oral da paciente dentada, segundo Kumar *et al.* (2003) [8], está entre os patógenos mais fortemente associados à periodontite e provavelmente possui um papel crucial no início da doença [9].

A hipossalivação está associada a um maior risco de infecções orais [10,11] e os achados deste trabalho sugerem que possivelmente é uma característica da síndrome. Além disso, a saliva possui um papel fundamental na manutenção da microbiota oral [11]. O nível de glicose salivar também parece ter influência na microbiota oral, estando em alta concentração, ocorre um decréscimo na carga bacteriana [12]. As alterações do microbioma salivar encontradas após a perda dentária das pacientes PLS também são esperadas, uma vez que, ao perder os dentes, ocorre a perda da superfície de aderência da placa bacteriana [13-15].

Este trabalho é o primeiro a reportar a alta abundância de *Archaea* no microbioma salivar humano. Algumas espécies possuem potencial pró-inflamatório e fazem parte do papel indireto ou direto na inflamação de alguns sítios específicos e são conhecidos por uma alta prevalência em locais com disbiose ou infecção [16]. A mudança do meio para bactérias fermentativas anaeróbicas também está acompanhada por um aumento de *Archaea* na doença periodontal grave [17]. Uma possível correlação entre a formação de uma placa subgingival agressiva com a presença de *Sulfophobococcus* e *Caldivirga* parece existir.

Atualmente, as pacientes desse estudo acabaram perdendo toda a dentição permanente, a não ser pelos terceiros molares que se encontram inclusos. Elas fazem uso de prótese total e continuam sob acompanhamento odontológico. Apesar da grande perda óssea encontrada nessas pacientes, existem alguns estudos onde foram realizadas a reabilitação oral através de implantes dentários, porém ainda não é muito evidente, devido o baixo número de publicações, se os implantes são considerados uma boa alternativa para esses casos [18]. Essas pacientes ainda se encontram em fase de crescimento, e por esse motivo a reabilitação através de implantes ainda está sendo estudada.

É evidente que a relação de interação entre microbiota e resposta do hospedeiro é o agente causal inicial da doença periodontal, porém, o entendimento da mudança patológica de uma periodontite contida e localizada para uma periodontite progressiva e destrutiva ainda não foi esclarecida [7,19]. O estudo desse tipo de síndrome, com uma destruição tão agressiva do periodonto, pode servir de modelo para um melhor entendimento de como a genética, as citocinas, fatores imunológicos e microbioma interagem resultando na periodontite.

4.2 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo a avaliação e análise da microbiota oral, perfil imunológico e clínico, com ênfase nas condições bucais de portadores da síndrome de Papillon-Lefèvre. Este estudo inicia evidenciando como a síndrome PLS afeta a qualidade de vida dos seus portadores. Por ser rara e pouco estudada, existe a necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos celulares da síndrome para favorecer o entendimento dessa e permitir adoção de medidas preventivas que possam reduzir os efeitos verificados. Este estudo sugere que a resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro, em conjunto com o microbioma oral, estão associados a um desequilíbrio na PLS. A investigação dos genes característicos da resposta inflamatória em tecidos pulpaes e do ligamento periodontal na paciente estudada mostrou significativa superexpressão de IL-3, TNF- α e VIM, um possível mecanismo de compensação da resposta imune nestes pacientes pela alta susceptibilidade a infecções bacterianas em algumas regiões do corpo. A disbiose do microbioma em conjunto com o papel fundamental dos neutrófilos, possui uma relação na manutenção da saúde oral e da pele. Foi observado uma microbiota diferente da reconhecida

previamente na periodontite agressiva, possivelmente favorecida por um habitat sulfídrico, que aparentemente é resistente ao tratamento convencional periodontal. Um possível consórcio de bactérias do gênero *Fusobacterium*, *Treponema*, *Tannerella*, *Sulfophobococcus* e *Bacteroidales* F0058 parece ser importante para condição periodontal desses pacientes, e mais estudos devem ser feitos a esse respeito. O microbioma salivar é bastante complexo e seu conhecimento na PLS é extremamente relevante na busca por tratamentos. Os mecanismos moleculares no prejuízo imunológico desses pacientes ainda não são conhecidos e mais estudos devem ser conduzidos nesse sentido. Muitos trabalhos exibem uma dificuldade decorrente a raridade da síndrome, nas quais as amostras são pequenas para resultados mais significativos.

4.3 REFERÊNCIAS

1. Bhavsar MV, Brahmbhatt NA, Sahayata VN, Bhavsar NV. Papillon-lefevre syndrome: Case series and review of literature. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2013;17(6):806.
2. Bullón P, Castejón-Vega B, Román-Malo L, Jimenez-Guerrero MP, Cotán D, Forbes-Hernandez TY, et al. Autophagic dysfunction in patients with Papillon-Lefevre syndrome is restored by recombinant cathepsin C treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018;142(4):1131-43. e7.
3. Jordan RC. Diagnosis of periodontal manifestations of systemic diseases. *Periodontology 2000*. 2004;34(1):217-29.
4. Tumen DS, Tumen EC, Gunay A, Lacin N, Cetin SG. The typical appearance and CBCT images of the patient with papillon-lefevre syndrome: a case report. *Journal of International Dental and Medical Research*. 2015;8(3):128.
5. AlBarrak ZM, Alqarni AS, Chalisserry EP, Anil S. Papillon–Lefèvre syndrome: a series of five cases among siblings. *Journal of medical case reports*. 2016;10(1):260.
6. Patel S, Davidson L. Papillon–Lefèvre syndrome: a report of two cases. *International journal of paediatric dentistry*. 2004;14(4):288-94.

7. Soliman H, Eldeen HG, Mustafa MI. A novel nonsense mutation in cathepsin C gene in an Egyptian patient presenting with Papillon–Lefèvre syndrome. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2015;16(4):387-92.
8. Haneke E. The Papillon-Lefèvre syndrome: Keratosis palmoplantaris with periodontopathy. *Human genetics*. 1979;51(1):1-35.
9. Bhargava M, Chaudhary D, Gill S, Arora K, Kalra H. Papillon-Lefèvre Syndrome: Case Report and its Differential Diagnosis, Complications and Management. *Journal of Oral Health and Research*. 2011;2(2):85.
10. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*. 2014;42(D1):D633-D42.
11. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of periodontology*. 2018;89:S1-S8.
12. Hart TC, Hart PS, Bowden DW, Michalec MD, Callison SA, Walker SJ, et al. Mutations of the cathepsin C gene are responsible for Papillon-Lefevre syndrome. *Journal of medical genetics*. 1999;36(12):881-7.
13. Sadik CD, Noack B, Schacher B, Pfeilschifter J, Mühl H, Eickholz P. Cytokine production by leukocytes of Papillon–Lefèvre syndrome patients in whole blood cultures. *Clinical oral investigations*. 2012;16(2):591-7.
14. Padawe DS, Takate VS, Gunjekar TU. Papillon Lefevre's Syndrome: An unusual case with severe Periodontitis and Minimal Dermal Involvement. *JIDA: Journal of Indian Dental Association*. 2014;8(4).
15. Fischer J, Blanchet-Bardon C, Prud'homme J-F, Pavsek S, Steijlen PM, Dubertret L, et al. Mapping of Papillon-Lefevre syndrome to the chromosome 11q14 region. *European Journal of Human Genetics*. 1997;5:156-60.
16. Toomes C, James J, Wood AJ, Wu CL, McCormick D, Lench N, et al. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nature genetics*. 1999;23(4):421-4.

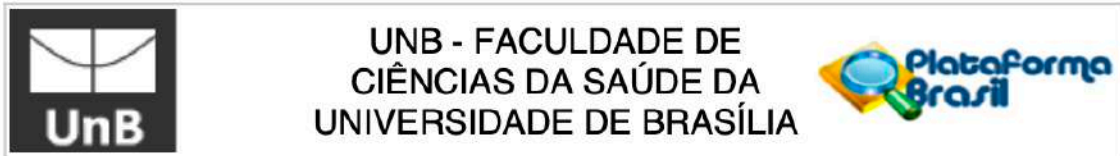
17. Alkhiary YM, Jelani M, Almramhi MM, Mohamoud HSA, Al-Rehaili R, Al-Zahrani HS, et al. Whole-exome sequencing reveals a recurrent mutation in the cathepsin C gene that causes Papillon–Lefevre syndrome in a Saudi family. *Saudi journal of biological sciences*. 2016;23(5):571-6.
18. Atarbashi-Moghadam F, Atarbashi-Moghadam S, Kazemifard S, Sijanivandi S, Namdari M. Oral rehabilitation of Papillon-Lefèvre syndrome patients by dental implants: a systematic review. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2020 Aug 31;46(4):220-227
19. Khan FY, Jan SM, Mushtaq M. Papillon–Lefevre syndrome (PLS) without cathepsin C mutation: A rare early onset partially penetrant variant of PLS. *The Saudi dental journal*. 2014;26(1):25-8.

CAPÍTULO 5 – PRESS RELEASE

A Síndrome de Papillon-Lefèvre é uma condição rara que está normalmente ligada a casamentos entre primos. Por ser uma síndrome rara, não existem tantos trabalhos sobre o assunto e, por isso, existe a necessidade de mais estudos para que possamos entender melhor a condição. Suas características principais são lesões de pele e perda dos dentes de leite e definitivos antes da hora. Este trabalho mostra como a síndrome afeta a qualidade de vida das pessoas portadoras, em especial na região da boca, e como suas características são agressivas. A perda das estruturas de suporte dos dentes pela doença periodontal agressiva gera sensibilidade e perda dos dentes, atrapalhando a alimentação e a vida social desses pacientes. Neste trabalho, avaliamos três irmãs que possuem a síndrome, filhas de pais que são primos. A primeira avaliação foi a parte imunológica dessas pacientes, na qual notamos uma superexpressão de genes que estão ligados à resposta inflamatória nos tecidos avaliados. A segunda avaliação deste estudo foi dos microrganismos encontrados na saliva dessas pacientes, comparando a irmã que ainda possui dentes na boca com as duas irmãs que já perderam todos os dentes devido a doença periodontal. Foi observado que tratamentos tradicionais para a doença periodontal, nesses pacientes, não funcionaram. Acredita-se que a combinação de um desequilíbrio dos microrganismos presentes, juntamente com a superexpressão de genes associados à inflamação e um defeito na resposta imunológica desses pacientes pode gerar uma doença periodontal mais agressiva que a conhecida em pacientes normais. Essas descobertas são importantes para melhor entendermos essa condição e para a busca de tratamentos mais eficientes para esses pacientes.

ANEXO

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO CLÍNICA, PERFIL IMUNOLÓGICO E MICROBIOTA BUCAL DE PORTADORES DA SÍNDROME DE PAPILLON LEFÈVRE COM PERIODONTITE

Pesquisador: Laudimar Oliveira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 99311218.0.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.974.167

Apresentação do Projeto:

De acordo com o pesquisador: “A síndrome de Papillon-Lefèvre é uma condição rara, autossômica recessiva e hereditária, que se caracteriza por hiperqueratose palmo-plantar e doença periodontal agressiva inicialmente identificada na infância. A doença periodontal leva à perda prematura da dentição decídua e permanente. Na odontologia sua relevância se encontra no comprometimento das estruturas de suporte dentárias. A evolução da infecção é rápida e pode levar a perda precoce de toda a dentição. A gengiva se encontra hemorrágica e hiperplásica associada com perda de massa óssea e dentária. As bactérias envolvidas são as mesmas encontradas em doenças periodontais de pacientes sistemicamente saudáveis. O objetivo da presente pesquisa é a avaliação da microbiota bucal, perfil imunológico e clínico com ênfase nas condições bucais. Considerando a literatura atual e a análise dos resultados encontrados, intenciona-se melhor compreensão quanto à progressão e as múltiplas causas e efeitos da doença para assim traçar novas estratégias terapêuticas como forma de reduzir os efeitos deletérios identificados nos portadores da síndrome. Serão analisadas seis pacientes, sexo feminino, sendo três irmãs portadoras da síndrome de Papillon Lefèvre. Todas serão submetidas a exame clínico minucioso, com anamnese, exame físico extra e intraoral, exame radiográfico, além das características sistêmicas relacionadas ao perfil desses pacientes. Adicionalmente, será realizada coleta de amostras da saliva (análise das

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

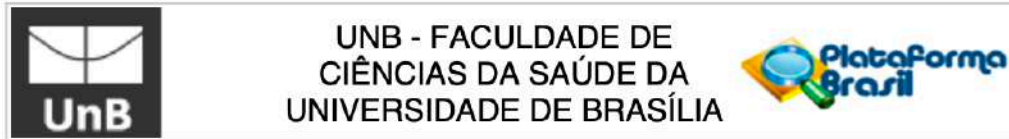
CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.974.167

características bioquímicas), sangue para análise de elementos figurados das pacientes que serão confrontados com os dados da literatura e amostras microbianas obtidas a partir do sulco gengival e saliva para análise das culturas dos gêneros e espécies microbianas. O presente trabalho será dividido em 5 fases. Fase 1: revisão de literatura, desenvolvimento do projeto e submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa; Fase 2: exame físico e clínico, extrabucal e intrabucal, exame de imagens e laboratorial; Fase 3: análise das imagens e dos exames laboratoriais, dos exames periodontais, e tratamento periodontal; Fase 4: redação, discussão e revisão final; e Fase 5: formatação e submissão para publicação e apresentações em fóruns científicos.”

Objetivo da Pesquisa:

"Objetivo Primário:

O objetivo dessa pesquisa é a avaliação e análise da microbiota bucal, perfil imunológico e clínico com ênfase nas condições bucais dos portadores da síndrome de Papillon Lefevre.

Objetivos Secundários:

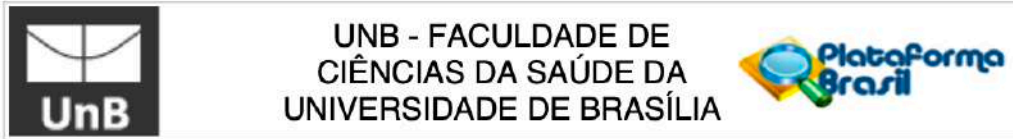
- 1 - Analisar o perfil genético dos portadores da síndrome de Papillon Lefevre;
- 2 - Analisar a microbiota dos portadores da síndrome de Papillon Lefevre;
- 3 - Analisar o perfil imunológico dos portadores da síndrome de Papillon Lefevre;
- 4 - Analisar a presença de doença periodontal e a gravidade em portadores da síndrome de Papillon Lefevre.
- 5 - Analisar, por meio de sequenciamento, a presença de mutações no gene Cathepsin C (CTSC). Em especial, mutações do Exon 7, a partir de DNA genômico (gDNA) coletado de amostras de sangue periférico dos pacientes portadores da Síndrome Papillon-Lefèvre e de amostras paternas.
- 6 - Avaliar por real-time PCR (qPCR) a expressão dos genes Vimentin (VIM), cAMP Responsive Element Binding Protein 1 (CREB1), Retinol Binding Protein 1 (RBP1), Cathepsin C (CTSC) e Calpain 1 (CAPN1), em amostras da polpa dentária de dentes indicados para exodontia pela própria condição clínica da Síndrome Papillon-Lefèvre e de terceiros molares de pacientes saudáveis indicados para exodontia por motivo ortodôntico (grupo controle, CT.)"

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos:

Além do risco de exposição das identidades dos portadores da doença, não haverá riscos adicionais. Os tratamentos que serão propostos fazem parte da rotina clínica necessária para os

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.974.167

portadores de alterações periodontais e/ou hiperkeratose. Não haverá procedimento clínico de perfil experimental. Quaisquer riscos inerentes aos procedimentos clínicos, raspagem periodontal, exodontias ou tratamento dermatológico serão devidamente resolvidos pela equipe de pesquisa.

Benefícios:

Os benefícios diretos para os pacientes sindrômicos serão a redução dos efeitos deletérios da síndrome, a melhoria da qualidade de vida por meio de reabilitação e a confirmação genética da presença da síndrome. Os benefícios indiretos serão por meio da melhor compreensão dos sinais e sintomas relacionados à síndrome e suas possibilidades terapêuticas. Para os pacientes do grupo controle evidencia-se como benefício o tratamento periodontal e a reabilitação da função bucal."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de trabalho de conclusão de curso e iniciação científica do Departamento de Odontologia da FS da Universidade de Brasília, sob responsabilidade do professor Laudimar Alves de Oliveira.

O estudo prevê a participação de 6 pacientes do sexo feminino em tratamento na clínica de odontologia do HUB. Serão submetidas a exame clínico, exame intra e extra bucal, exames de imagem radiográfica e tomografia, fotografias, exame de sangue e saliva, tratamento periodontal e restaurador.

Orçamento detalhado no valor total de R\$ 4.000,00, com financiamento próprio.

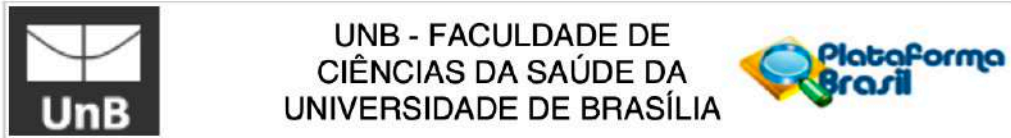
O cronograma de execução de atividades prevê data para o início da coleta de dados a partir do mês de outubro de 2018.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos analisados para emissão do presente parecer:

1. Carta de encaminhamento ao CEP/FS: assinada pela pesquisadora - documento em versão editável "cartaencaminhamentoprojetopapillon.docx", postado em 24/09/2018 e versão não editável "cartadeencaminhamento.pdf", postado em 08/09/2018.
2. Informações básicas do projeto não editável: "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1136993.pdf" postado em 24/09/2018.
3. Termo de responsabilidade e compromisso de ciência e cumprimento da Res. CNS 466/2012, assinado pelo pesquisador responsável: "termoderesponsabilidadeecompromissopesquisador.docx", postado em 24/09/2018 e "termopesquisadorprincipal.pdf", postado em 08/09/2018.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.974.167

4. Termos de concordância de coparticipação: assinados pela Superintendente do Hospital Universitário de Brasília, Dra. Elza Ferreira Noronha e pelo Chefe do Setor de Pesquisa e Inovação Tecnológica, Fernando Araújo R. de Oliveira, pelo anexo "TermodecienciaparticipantePapillon.doc", postado em 24/09/2018 e "termodecienciadecoparticipante.pdf", postado em 08/09/2018.
5. Orçamento do projeto: "orcamentopapillon.docx", postado em 08/09/2018.
6. Folha de rosto assinada pelo pesquisador responsável e com assinatura e carimbo da Profª Maria Cristina Soares Rodrigues, Vice-Diretora da FS, como instituição proponente – documento não editável: "folhaderostoCEP.pdf" postado em 08/09/2018.
7. Modelo de TCLE: documento editável – "tclepapillon.docx", postado em 08/09/2018.
8. Currículo Lattes dos pesquisadores: currículo Lattes da pesquisador orientador Professor Laudimar Alves de Oliveira "LattesLaudimarOLiveira.pdf" e dos estudantes "LattesVitorRamagem.pdf", "LattesLuanderMedrado.pdf", "LattesGiuliaLettieri.pdf", postados em 10/04/2018.
9. Projeto detalhado: versão editável "projetopapillon.docx", postado em 08/09/2018.
10. Cronograma da pesquisa: "cronogramapapillon.docx", postado em 08/09/2018.
11. Modelo de carta de autorização da chefia de área da clínica de Odontologia do HUB: "CartaChefiadaareaPapillon.doc", postado em 24/09/2018.
12. Termo de autorização de uso de imagem de som e voz: "termodeimagemesomcorreto.doc", postado em 08/09/2018.
13. Modelo do te: "talepapillon.docx", postado em 08/09/2018.

Recomendações:

Não se aplicam.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há óbices éticos para realização do presente protocolo de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com a Resolução CNS 466/12, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



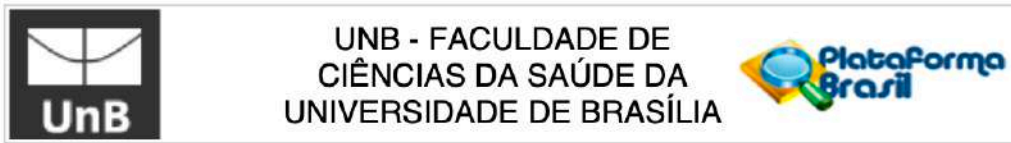
UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 2.974.167

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1136993.pdf	24/09/2018 20:31:58		Aceito
Outros	CartaChefiadaareaPapillon.doc	24/09/2018 20:27:19	Laudimar Oliveira	Aceito
Outros	TermodecienciaparticipantePapillon.doc	24/09/2018 20:25:16	Laudimar Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termoderesponsabilidadeecompromisso pesquisador.docx	24/09/2018 20:19:41	Laudimar Oliveira	Aceito
Outros	cartaencaminhamentoprojetopapillon.docx	24/09/2018 20:15:20	Laudimar Oliveira	Aceito
Outros	LattesVitorRamagem.pdf	24/09/2018 20:12:43	Laudimar Oliveira	Aceito
Outros	LattesLuanderMedrado.pdf	24/09/2018 20:12:11	Laudimar Oliveira	Aceito
Outros	LattesGiuliaLettieri.pdf	24/09/2018 20:11:37	Laudimar Oliveira	Aceito
Outros	LattesLaudimarOLiveira.pdf	24/09/2018 20:10:20	Laudimar Oliveira	Aceito
Orçamento	orcamentopapillon.docx	08/09/2018 12:34:36	Laudimar Oliveira	Aceito
Cronograma	cronogramapapillon.docx	08/09/2018 12:32:53	Laudimar Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetopapillon.docx	08/09/2018 12:31:11	Laudimar Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeimagemesomcorreto.doc	08/09/2018 12:27:44	Laudimar Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	talepapillon.docx	08/09/2018 12:27:28	Laudimar Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclepapillon.docx	08/09/2018 12:27:01	Laudimar Oliveira	Aceito
Outros	cartadeencaminhamento.pdf	08/09/2018 12:22:43	Laudimar Oliveira	Aceito
Outros	termodeconcordanciainstitucional.pdf	08/09/2018 12:21:59	Laudimar Oliveira	Aceito
Outros	termodecienciadecoparticipante.pdf	08/09/2018 12:20:47	Laudimar Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termocoparticipante.pdf	08/09/2018 12:18:37	Laudimar Oliveira	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.974.167

Folha de Rosto	folhaderostoCEP.pdf	08/09/2018 12:15:25	Laudimar Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termopesquisadorprincipal.pdf	08/09/2018 12:12:21	Laudimar Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 22 de Outubro de 2018

Assinado por:
Marie Togashi
(Coordenador(a))

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com