HENRIQUE FUKUSHIMA

**Efeito da severidade da doença periodontal sobre a expressão do Receptor
Ativado por Protease do Tipo 2 (PAR-2)**

São Paulo
2014

HENRIQUE FUKUSHIMA

**Efeito da severidade da doença periodontal sobre a expressão do Receptor
Ativado por Protease do Tipo 2 (PAR-2)**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Fukushima, Henrique.

Efeito da severidade da doença periodontal sobre a expressão do Receptor Ativado por Protease do Tipo 2 (PAR-2) / Henrique Fukushima; orientadora Marinella Holzhausen Caldeira. -- São Paulo, 2014.

54 p. : fig., tab., ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Periodontite crônica. 2. Porphyromonas gingivalis. 3. Tratamento periodontal. 4. Periodontia. I. Caldeira, Marinella Holzhausen. II. Título.

Fukushima H. Efeito da severidade da doença periodontal sobre a expressão do Receptor Ativado por Protease do Tipo 2 (PAR-2). Dissertação Apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológica.

Aprovado em: / /2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____.

Instituição:_____Julgamento:_____.

Prof(a). Dr(a)._____.

Instituição:_____Julgamento:_____.

Prof(a). Dr(a)._____.

Instituição:_____Julgamento:_____.

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Élio e Lucimeire, pelo apoio sempre presente, pelos ensinamentos da vida e principalmente por todo amor e carinho recíprocos. Serei eternamente grato!

A meu irmão, amigo e companheiro, Victor, com quem compartilho a maioria das minhas lembranças. Muito obrigado, irmão!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira, por todo o ensinamento passado, e ainda mais por despertar a vontade de aprender e buscar o conhecimento. Serei sempre grato a sua confiança, dedicação e paciência.

Ao Prof. Titular Giuseppe Alexandre Romito, pelos ensinamentos passados nos seminários de literatura, sempre com muito conteúdo e críticas construtivas.

Aos professores da disciplina Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti, Prof. Dr. Giorgio de Micheli, Prof. Dr. Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima, Profa. Dra. Cristina Cunha Villar, Prof. Dr. João Batista Cesar Neto, Profa. Dra. Luciana Saraiva, Prof. Dr. Marco Antônio Paupério Georgetti e Profa. Dra. Marina Conde, pelo conhecimento passado durante todo o curso e sempre dispostos a ajudar.

Aos pacientes, que tornaram o estudo possível.

Aos meus amigos de mestrado Daniela Yumie Takahashi, Ieda Santos Abreu, Michelle De Franco Rodrigues, Priscila Vivas da Cruz, Stefania Maria Bernardi Possamai, Vanessa Camilo de Almeida pelo apoio e companheirismo.

As colaboradoras de trabalho, Vanessa Euzébio Túbero Alves e Verônica Franco de Carvalho, sem vocês esse trabalho não seria possível.

Aos demais alunos da pós-graduação pelo conhecimento compartilhado, em especial a Caio Cremonini, Carlos Eduardo Secco Mafra, Henrique Aparecido Bueno da Silva, Marcelo Sirolli e Rodrigo Nahas de Castro Pinto.

Ao Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira e Profa. Dra. Luciana Saraiva pelas considerações na qualificação.

As secretarias do Departamento de Estomatologia, Iracema Mascarenhas Pires, Maria Cecília Forte Muniz, Márcia Maria dos Santos, Marírla Camargo Gomes, Regina Maria da Conceição Santos, por toda ajuda desde o início do mestrado.

À Samira Helena João de Souza pelo companheirismo e amizade.

Ao meus grandes amigos, Daniel Isaac Sendyk, Fábio Lopes Duarte, Lucas Ambrósio Macedo e Renan Yudi Kato por toda ajuda e amizade, nos bons e maus momentos, desde a graduação.

*"A resposta certa, não importa nada: o essencial é que as
perguntas estejam certas."*

Mário Quintana

RESUMO

Fukushima H. Efeito da severidade da doença periodontal sobre a expressão do Receptor Ativado por Protease do Tipo 2 (PAR-2) [dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Pesquisas recentes investigando o receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR-2) sugerem uma associação entre este receptor e a inflamação periodontal. Além disso, é sabido que a gingipaína, protease bacteriana secretada por um importante periodontopatógeno, *Porphyromonas gingivalis* (Pg), tem a capacidade de ativar o PAR-2. Ademais, um estudo anterior do grupo, verificou que quanto mais profunda a bolsa periodontal, maior era a expressão do receptor PAR-2. No entanto, não é sabido se a expressão de PAR-2 é proporcional a severidade de doença periodontal e a quantidade de gingipaína expressa na bolsa periodontal. Desta forma, o presente estudo, verificou no fluido gengival a correlação entre a expressão gênica de PAR-2 (Real Time-PCR) com os parâmetros clínicos periodontais, e a expressão gênica da protease gingipaína em pacientes com periodontite crônica severa e moderada, antes e após o tratamento periodontal não-cirúrgico. A expressão de PAR-2 e da protease gingipaína foi estatisticamente maior nos pacientes do grupo periodontite crônica severa (PS) em comparação com os pacientes do grupo periodontite crônica moderada (PM) e controle (C). Além disso, o tratamento periodontal levou à redução significativa ($p < 0.05$) da expressão de PAR-2 nos pacientes com periodontite crônica moderada. Em conclusão, dentro dos limites do presente estudo, nós demonstramos que a severidade da doença periodontal e a expressão de gingipaína influenciaram a expressão de PAR-2 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica.

Palavras-chave: Periodontite crônica. PAR-2. *Porphyromonas gingivalis*. Gingipaína.

ABSTRACT

Fukushima H. Effect of the severity of periodontal disease on the expression of Protease Activated Receptor Type 2 (PAR-2) [dissertation] São Paulo: University of São Paulo, School of Dentistry, 2014. Versão Corrigida.

Recent studies investigating the protease-activated receptor type 2 (PAR-2) suggest an association between the receptor and periodontal inflammation. In addition, it is known that gingipain, a bacterial protease secreted by an important periodontopathogen, *Porphyromonas gingivalis* (Pg), has the ability to activate PAR-2. Furthermore, a previous study from our group found that the deeper the periodontal pocket, the higher the expression of the PAR-2 receptor. However, it is not known whether the expression of PAR-2 is associated to the severity of periodontal disease and the amount of gingipain expressed in the periodontal pocket. Thus, the present study verified, in the gingival fluid, the correlation between the PAR-2 gene expression (Real Time-PCR) with the clinical periodontal parameters, and the gene expression of the gingipain protease in patients with moderate and severe chronic periodontitis before and after non-surgical periodontal treatment. PAR-2 expression and gingipain protease were statistically more expressed in patients of the severe chronic periodontitis group (PS) compared with those in the moderate chronic periodontitis group (PM) and control group (C). Furthermore, periodontal treatment led to a significant reduction ($p < 0.05$) in the expression of PAR-2 in patients with moderate chronic periodontitis. In conclusion, within the limits of the present study, we demonstrated that the severity of periodontal disease and the expression of gingipain influenced the PAR-2 expression in the gingival fluid of patients with chronic periodontitis.

Keywords: Chronic periodontitis. PAR-2. *Porphyromonas gingivalis*. Gingipain.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 - Médias e Desvio Padrão da expressão de PAR-2 antes e após o tratamento periodontal não cirúrgico.....34
- Figura 5.2 - Médias e Desvio Padrão da expressão gênica da protease bacteriana gingipaina, produto da Pg, antes e após o tratamento35

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Sequências de primers utilizados no PCR em tempo real.....	29
Tabela 5.1- Dados demográficos	31
Tabela 5.2- Média e Desvio Padrão dos dados clínicos da boca toda	32
Tabela 5.3- Média e Desvio Padrão dos dados clínicos apenas dos sítios analisados	33

LISTA DE ABREVIATURAS

PAR-2	Receptor Ativado por Protease do tipo 2
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PCR	Polimerase Chain Reaction
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
SLIGRL	Agonista sintético seletivo de PAR-2
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
IL-1	Interleucina 1
LPS	Lipopolissacarídeos
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
AAP	American Academy of Periodontology
P3	Proteinase 3 de neutrófilo
MCP-1	Proteína-1 quimiotática de monócitos
MMP	Metaloproteinase da matriz
s	Segundos
IPV	Índice de placa visível
IS	Índice de sangramaneto
PCS	Profundidade clínica de sondagem
NIC	Nível clínico de inserção
Min	Minutos
DEPC	Dietilpirocarbonato – inibidor de RNAase

LISTA DE SÍMBOLOS

mm	Milímetros
μl	Microlitro
ml	Mililitros
pH	Potencial de hidrogênio
g	Força gravitacional (10m/s^2)
°C	Graus Celsius
mM	MiliMol
V	Volts
kg	Kilogramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Receptor Ativado por Protease do tipo 2.....	16
2.2 Receptor Ativado por Protease do tipo 2 e Inflamação.....	17
2.3 Receptor Ativado por Protease do tipo 2 e Doença Periodontal.....	17
3 PROPOSIÇÃO.....	20
4 MATERIAL E MÉTODO.....	21
4.1 Delineamento experimental e casuística.....	21
4.2 Avaliação dos parâmetros clínicos periodontais.....	23
4.3 Tratamento periodontal não-cirúrgico e reavaliação dos parâmetros clínicos.....	23
4.4 Coleta da amostra de fluido gengival.....	24
4.5 Avaliação da expressão gênica de PAR-2 e de gingipaína por Real Time-PCR.....	25
4.6 Análise estatística.....	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Parâmetros Clínicos.....	31
5.2 Análise da expressão de PAR-2.....	33
5.3 Análise da expressão da gingipaína.....	34
6 DISCUSSÃO.....	36
7 CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

Os receptores ativados por protease (PARs) pertencem a uma família de receptores de sete domínios transmembrânicos, acoplados a uma proteína G. A ativação desses receptores ocorre através da clivagem proteolítica do domínio extracelular, gerando um novo ligante N-terminal, o qual se ligará ao segundo loop transmembrânico desencadeando uma sinalização intracelular. Até o presente momento 4 tipos de PAR foram identificados: PAR-1, -2, -3 e -4. Esses receptores possuem mecanismos de ativação semelhantes, no entanto podem apresentar diferentes funções e distribuições nos tecidos, além de poderem ser ativados por diversas proteases (Bohm et al., 1996; Ossovskaya; Bunnett., 2004).

Estudos anteriores demonstraram que o PAR-2 participa de processos inflamatórios *in vitro* e *in vivo* tais como rolamento de neutrófilos, adesão e extravasamento de leucócitos, aumento da permeabilidade vascular, edema, recrutamento de granulócitos e degranulação de mastócitos (Molino et al., 1997; Corvera et al., 1997; Vergnolle et al., 1999a, 1999b).

Recentemente, alguns estudos têm sugerido o envolvimento de PAR-2 na doença periodontal (Lourbakos et al., 1998, 2001a, 2001b; Holzhausen et al., 2005, 2006; Holzhausen et al., 2010; Fagundes et al., 2011; Euzébio-Alves et al., 2013).

Lourbakos et al., em 1998, reportaram que cisteíno-proteases bacterianas como a gingipaína, produzida pela *Porphyromonas gingivalis* (Pg), tem a capacidade de ativar o PAR-2 em células epiteliais orais e induzir a secreção da citocina pró-inflamatória, interleucina 6 (IL-6), a qual tem a capacidade de estimular osteoclastos e reabsorção óssea. Em estudos anteriores do nosso grupo foram avaliados os efeitos *in vivo* da ativação de PAR-2, por um agonista seletivo, na doença periodontal induzida em ratos (Holzhausen et al., 2005). Esse agonista levou a inflamação periodontal e perda óssea alveolar, através de um mecanismo envolvendo a liberação de prostaglandina e ativação de metaloproteinases da matriz (MMPS). Posteriormente, estudos em humanos verificaram que pacientes com periodontite crônica moderada apresentavam maior expressão de PAR-2 do que pacientes saudáveis (Holzhausen et al., 2010) e que sítios periodontais mais profundos e com maior presença de Pg exibiam uma maior expressão de PAR-2. Assim, estes trabalhos da literatura sugerem um forte envolvimento da ativação

de PAR-2 na indução da inflamação e da perda óssea na periodontite crônica. Em estudo recente de Euzébio-Alves et al (2013) foi observado que o tratamento periodontal reduziu significativamente a expressão de PAR-2 e da gingipaína em pacientes com periodontite crônica moderada.

O estudo de Holzhausen et al. (2010), mostrou que sítios periodontais com maior profundidade de sondagem estavam associados com uma maior expressão de PAR-2. Ainda, Euzébio-Alves et al. (2013) verificaram que o tratamento periodontal não cirúrgico reduziu a expressão do receptor e da gingipaína, demonstrando que o aumento da expressão de PAR-2 em pacientes doentes é um reflexo da infecção periodontal e não uma característica constitutiva de risco. No entanto, até o presente momento não é sabido se a severidade da doença está associada à uma maior expressão de PAR-2. Dessa forma, a hipótese deste estudo é que na periodontite crônica severa ocorre uma maior expressão do receptor PAR-2 comparada à periodontite crônica moderada, devido à maior concentração de seus possíveis ativadores bacterianos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Receptor Ativado por Protease do tipo 2

Os PARs foram identificados durante os anos noventa, pelos estudos de Vu et al. (1991), Rasmunssen et al. (1991) e Coughlin et al. (1992). O primeiro receptor a ser caracterizado e clonado foi o PAR-1, na época denominado como receptor ativado por trombina. O mecanismo de ativação dos PARs consiste na clivagem proteolítica do domínio extracelular, o que gera um novo domínio N-terminal que age como um auto ativador do receptor (Hoxie et al., 1993; Ishii et al., 1994). Após ativação o receptor é internalizado, direcionado a lisossomos e digerido. Ativações subsequentes são dependentes da sintetização e reposição de novos receptores na superfície celular. Logo, esses receptores são passíveis de uma única ativação (Déry et al., 1999; Ossovskaya; Bunnett, 2003).

Até o presente momento foram descobertos quatro tipos diferentes de PARs, o PAR-1 (Vu et al., 1991), o PAR-2 (Nysted et al., 1994), o PAR-3 (Ishihara et al., 1997) e o PAR-4 (Xu et al., 1998).

Em 1994 Nysted et al. identificaram o PAR-2 e demonstraram que sua ativação dava-se pela tripsina e não pela trombina. Devido a sua semelhança estrutural com o receptor ativado por trombina, denominaram-no PAR-2, sendo o anteriormente descoberto chamado de PAR-1. O mesmo grupo em 1995, identificou a presença de PAR-2 nos rins, fígado, pâncreas, intestino delgado e cólon (Nysted et al. 1995a, 1995b).

Até o presente momento é sabido que o PAR-2 pode ser encontrado em células epiteliais, endoteliais, fibroblastos, osteoblastos, neutrófilos, miócitos, neurônios e astrócitos (Abraham et al., 2000; Ossovskaya; Bunnett, 2003). Nos estudos de Molino et al. (1997) e Corvera et al. (1997), foi revelado que, além da tripsina, o PAR-2 pode ser ativado por triptase de mastócitos e fator tecidual Xa. Outros ativadores de PAR-2 são a proteinase 3 de neutrófilos, fator tecidual VIIa e serino protease 1 (Vergnolle et al., 2001a, 2001b; Loubakos et al., 2001a, 2001b; Holzhausen et al., 2005).

2.2 Receptor-Ativado por Protease-tipo 2 e Inflamação

Estudos *in vitro* demonstraram que a ativação de PAR-2 em células do cordão umbilical leva ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, desta forma evidenciando o envolvimento de PAR-2 na inflamação (Nysted et al., 1996).

Howells et al. (1997) demonstraram que a ativação de PAR-2 em neutrófilos, uma importante célula de defesa promove a expressão de CD11b. O CD11b atua na adesão de neutrófilos ao endotélio, que sugere o envolvimento de PAR-2 na adesão de neutrófilos à parede vascular. Vergnolle et al. (1999a) verificaram que a utilização de agonistas sintéticos de PAR-2 em cavidade peritoneal de ratos levava ao rolamento, adesão e extravasamento de leucócitos. Ainda Vergnolle et al. (1999b) demonstraram que a ativação de PAR-2 leva ao aumento da permeabilidade vascular, infiltração granulocítica e degranulação de mastócitos.

Estudos recentes em humanos evidenciam o envolvimento de PAR-2 na inflamação em diversos tecidos do organismo, tais como, no tecido adiposo (Lim et al., 2013), nos tecidos oculares (Yeoh et al., 2011), polpa dental (Lundy et al., 2010), sistema nervoso central (Noorbakhsh et al., 2006) e vias aéreas (Knight et al., 2001).

Juntos, estes estudos evidenciam que o PAR-2 é expresso em importantes células envolvidas na inflamação e que sua ativação leva a evidentes sinais inflamatórios.

2.3 Receptor-Ativado por Protease-tipo 2 e Doença Periodontal

Lourbakos et al. (1998), verificaram que o PAR-2 em neutrófilos era ativado pela gingipaína, uma protease com atividade tripsínica produzida pela Pg, um dos principais patógenos da doença periodontal.

Continuando seus estudos com gingipaína e PARs, Lourbakos et al. (2001a) demonstraram que a ativação de PAR-2 em células epiteliais orais tratadas com agonistas sintéticos seletivos, tripsina ou gingipaína, causa um aumento da produção de interleucina 6 (IL-6), um importante mediador inflamatório capaz de

induzir a diferenciação de osteoclastos, linfócitos B e ativação de linfócitos T (Nibali et al., 2012).

Em um estudo *in vivo*, por meio de aplicação tópica gengival de um agonista seletivo de PAR-2 (SLIGRL), Holzhausen et al. (2005), induziram a periodontite em ratos caracterizada pela perda óssea alveolar e infiltração granulocítica periodontal. Neste estudo, foi concluído que a ativação de PAR-2 causa periodontite por um mecanismo envolvendo produção de prostaglandina e ativação de MMPs. Em um estudo subsequente, utilizando camundongos geneticamente modificados que não expressavam PAR-2, Holzhausen et al. (2006) concluíram que esses animais apresentavam uma resposta inflamatória reduzida quando inoculados subcutaneamente com Pg, em comparação com camundongos normais. Da mesma forma, a inoculação de Pg em sítios periodontais dos camundongos que não expressavam PAR-2, estes apresentavam uma perda óssea menor do que a observada em camundongos normais. Dessa forma estes estudos *in vivo* demonstraram que a ativação de PAR-2 poderia estar envolvida com o desenvolvimento da doença periodontal.

Uehara et al. (2008), verificaram que a ativação de PAR-2 pela gingipaina arginina específica 2 (RgpB) levava a um aumento da produção de interleucina 8 (IL-8) em células epiteliais orais. A quimiocina IL-8 é uma importante citocina na resposta inata, desempenhando um papel inicial na inflamação, aumentando a fagocitose, morte bacteriana, liberação de lisozimas e geração de superóxidos.

No estudo de Holzhausen et al. (2010) foi demonstrado o papel de PAR-2 na periodontite crônica moderada em humanos. Nesse trabalho pacientes com periodontite crônica apresentavam uma maior expressão de PAR-2 associada à presença de proteinase 3 de neutrófilos (P3) e Pg. Foi observado também que quanto mais profunda era a bolsa periodontal, maior era a expressão de PAR-2 e maiores eram os níveis de IL-1 α , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Com isso os autores sugeriram que o PAR-2 desempenha um papel mediador da inflamação periodontal.

Fagundes et al. (2011) avaliaram o efeito da presença da Pg nos sítios periodontais em relação a expressão gênica de PAR-2 em células creviculares de pacientes com periodontite crônica moderada. Os autores observaram que os sítios com presença de Pg apresentavam uma maior média de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, porcentagem de sangramento a sondagem e

volume de fluido crevicular aumentado quando comparados a sítios sem a presença de Pg. Além disso, com exceção da IL-8, todos os outros mediadores inflamatórios avaliados, como IL-1 α , IL-6 e TNF- α , estavam aumentados em sítios com presença de Pg. Estes autores concluíram que na periodontite crônica moderada, sítios positivos para Pg apresentam maior atividade proteolítica total, maior expressão de PAR-2 no fluido gengival, e um perfil inflamatório mais evidente.

Mais recentemente, o trabalho de Euzébio-Alves et al. (2013) avaliaram o efeito do tratamento periodontal não cirúrgico na expressão de PAR-2 em células do fluido gengival de pacientes com periodontite crônica moderada. Os autores observaram que uma maior expressão de PAR-2 estava associada com a presença de sinais clínicos de inflamação periodontal e níveis elevados de IL-6, IL-8, MMP-2, MMP-8, fator de crescimento de hepatócitos, TNF- α e fator de crescimento de vasos endoteliais (VEGF). Níveis elevados de P3 e gingipaína, e níveis baixos de dentilisina, inibidores de protease e inibidor de secreção de protease de leucócitos também estavam associados a uma maior expressão de PAR-2. Nos sítios saudáveis dos indivíduos doentes, encontrou-se níveis baixos de proteases bacterianas foram associados a uma menor expressão de PAR-2, sugerindo que a expressão de PAR-2 é influenciada pela presença de infecção, e não é uma característica constitutiva de risco a doença periodontal.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral:

Verificar o efeito da severidade da doença periodontal sobre a expressão de PAR-2 no fluido gengival

Objetivos específicos:

Avaliar a expressão do receptor PAR-2 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica severa, comparando com a expressão encontrada em pacientes saudáveis e pacientes com periodontite crônica moderada.

Avaliar o efeito do tratamento periodontal sobre a expressão de PAR-2 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica moderada e severa.

Avaliar a associação da expressão de PAR-2 no fluido gengival com a expressão da protease gengival em pacientes com periodontite crônica severa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção de Pacientes

O presente estudo foi delineado como um ensaio clínico controlado paralelo. Para o cálculo amostral nos baseamos em estudos prévios, os quais mostraram uma grande diferença entre os grupos (quanto a expressão de PAR-2), fizemos o cálculo que mostrava uma necessidade de 17 pacientes. Considerando uma perda de 10%, resolvemos incluir 19 pacientes por grupo de estudo. Usando um desvio padrão de 1,5 e uma diferença a ser detectada de 2 com um nível de significância de 5% e poder estatístico de 90%, para o parâmetro da expressão genica de PAR-2.

O projeto teve aprovação no Comitê de Ética em pesquisa da FOUSP de acordo com o parecer 106/2010 (Anexo A). Após serem advertidos sobre a natureza e objetivos do estudo os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

Os sujeitos da pesquisa foram incluídos consecutivamente de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Estes procuram o atendimento odontológico nas Clínicas da Disciplina de Periodontia da FOUSP.

Critérios de inclusão

- Ambos os sexos
- De 25 a 60 anos
- Apresentar boa saúde geral
- Portadores de Periodontite Crônica Generalizada Severa (grupo PS) – presença de profundidade clínica de sondagem > 6mm, nível clínico de inserção ≥ 4 mm em mais de 30% dos dentes presentes (Armitage, 1999)
- Portadores de Periodontite Crônica Generalizada Moderada (grupo PM) - presença de profundidade clínica de sondagem de 3 a 6 mm e nível clínico de inserção proximal entre 3-4 mm em mais de 30% dos dentes presentes (Armitage, 1999)
- Pacientes periodontalmente saudáveis (grupo C) - ausência de sinais clínicos de inflamação e/ou perda de inserção (Armitage, 1999)

Para anamnese e exame clínico foi utilizado a fixa de avaliação (Apêndice B).

Critério de exclusão

- Necessidade de antibioticoterapia profilática (Wilson et al., 2007)
- Pacientes diabéticos, fumantes, imunodeprimidos, gestantes ou lactantes
- Uso de medicamentos como fenitoína, ciclosporina e bloqueadores de cálcio como a nifedipina
- Tratamento periodontal prévio e/ou uso de antibiótico, nos últimos 6 meses
- Presença de discrepâncias oclusais severas e/ou uso de aparelhos ortodônticos
- Dentes pilares ou retentores de próteses, dentes com mobilidade grau II e III, dentes com lesão endodôntica
- Presença de menos de 15 dentes

Os parâmetros clínicos periodontais foram associados à expressão gênica do receptor PAR-2 em células creviculares (avaliados por real time-PCR). Foi então avaliada a expressão da gingipaína, produzida pela *Porphyromonas gingivalis*, por real time – PCR.

4.2 Avaliação dos parâmetros clínicos periodontais

Os seguintes parâmetros clínicos foram analisados na boca toda, sendo 6 sítios por dente: índice de placa visível (IPV) (Ainamo; Bay, 1975) (Anexo B), índice de sangramento à sondagem (IS) (Greenstein, 1981), profundidade clínica de sondagem (PCS) (Glavind; Løe, 1967) e nível clínico de inserção (NCI) (Glavind; Løe, 1967) (Anexo C). A avaliação clínica foi realizada por dois examinadores treinados e calibrados (VTEA e VFC). A calibração foi realizada antes do início do estudo e antes dos exames de reavaliação. Na calibração, os pacientes foram reexaminados, para as variáveis PCS e NCI, com um intervalo de uma semana entre os dois exames. A reprodutibilidade dos exames intra e inter examinadores foi verificada por meio do coeficiente de correlação intra-classe para as variáveis contínuas (PCS e NCI) e pelo coeficiente kappa (0.92 inter; 0.95 intra).

4.3 Tratamento periodontal não-cirúrgico e reavaliação dos parâmetros clínicos

Os pacientes portadores de periodontite crônica severa e moderada receberam tratamento periodontal não-cirúrgico (VTEA), na sequência descrita abaixo:

- Instrução de higiene oral para controle de placa bacteriana e remoção de cálculo supragengival com o uso de ultrassom.
- Eliminação de fatores iatrogênicos (restaurações, próteses, se necessário);

- Raspagem, alisamento e polimento corono-radicular com instrumentação manual e uso de ultrassom por sextante (aplicação de anestesia em caso de dor).
- Integração clínica (remoção de cáries e restauração provisória das cavidades, extração de dentes condenados, se necessário).
- Revisão dos procedimentos básicos.

Os pacientes saudáveis receberam tratamento de controle de saúde periodontal, o qual foi composto de:

- Instrução de higiene oral para controle de placa bacteriana.
- Eliminação de fatores iatrogênicos (restaurações, próteses, se necessário);
- Integração clínica (remoção de cáries e restauração provisória das cavidades, extração de dentes condenados, se necessário).
- Revisão dos procedimentos básicos.

As sessões para tratamento foram definidas de acordo com as características e condições apresentadas por cada paciente.

Finalizada a fase dos procedimentos básicos, foi iniciada a fase do pós tratamento, por um período de 45 dias. Dentro deste período, os pacientes receberam controle de placa bacteriana profissional semanal (orientação de higiene bucal, raspagem e profilaxia supra gengival) até o momento da reavaliação.

Na reavaliação, os pacientes foram reexaminados com os mesmos parâmetros clínicos iniciais conforme a avaliação clínica acima descrita. Neste momento foi verificado se os pacientes apresentavam controle de placa satisfatório e ausência de inflamação dos tecidos periodontais.

4.4 Coleta de amostra de fluido gengival

A coleta de amostra de fluido gengival crevicular foi realizada em quatro sítios por pacientes (um por quadrante), sendo a seleção do sítio baseada na profundidade clínica de sondagem, 6 mm para PS e de 3 a 6 PM, e na ausência de sangramento durante a coleta. Estas ocorreram no baseline e 45 dias após o tratamento periodontal. Após a remoção da placa supragengival com uma cureta periodontal, os sítios foram isolados com rolos de algodão estéreis e um sugador de saliva era utilizado para diminuir o risco de contaminação salivar, e os dentes delicadamente secos com jato de ar por 10 segundos. Foi utilizado um filtro especial para fluido gengival, perio-paper (Periopaper 12 Collection Strip, Oraflow, Plainview, NY, USA), que após o isolamento do campo foi introduzido no sulco gengival/bolsa periodontal onde permanecia durante 30 segundos. Após sua remoção, o volume de fluido crevicular foi determinado utilizando-se um aparelho apropriado (Periotron 6000, IDE Interstate, Amityville, NY) e calculado em μ l através de uma curva-padrão pré-estabelecida. O perio-paper foi colocado em tubos eppendorf contendo 400 μ l de solução tampão fosfato (pH 7.4), os quais foram agitados em vortex por 30 segundos. As amostras foram centrifugadas em microcentrífuga refrigerada por 10 minutos a 6000g, e o sobrenadante coletado e armazenado a - 80°C em 4 alíquotas diferentes de 100 μ l cada. O precipitado foi armazenado a - 80°C em tubos eppendorf codificados contendo 1 ml de reagente estabilizador de RNA, Tri-Reagente (Sigma, USA) até a realização das análises pretendidas.

4.5 Avaliação da expressão gênica de PAR-2 e de gingipaína por Real Time-PCR

A expressão gênica do receptor PAR-2 presente em amostras de fluido crevicular foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR) nas amostras de fluido crevicular gengival.

O RNA total (tRNA) foi obtido pela homogeneização das amostras do fluido crevicular em Trizol [isotiocinato de guanidina (TCG) em solução de fenol - Invitrogen Brasil LTDA (1mL/ 100µL de amostra)]. Após a homogeneização as amostras foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente e, então, centrifugadas a 12000 g (15 min, 4°C- Eppendorf Centrifuge 5417 R – Eppendorf, Califórnia, EUA). Posteriormente, 0,8mL da fase superior foi transferida para um novo tubo (Eppendorf) no qual era adicionado 0,2mL de clorofórmio. Após 15 segundos de agitação vigorosa por inversão, os tubos foram deixados em repouso por 2-3 min à temperatura ambiente, e posteriormente centrifugados a 12000 g (15 min a 4°C). A fase aquosa sobrenadante ($\approx$ 600 µL) foi, então, separada para novo tubo.

O tRNA foi precipitado pela adição de 1 volume de isopropanol 100% para cada volume de sobrenadante. Após 15 segundos de agitação vigorosa por inversão os tubos eram incubados por 10 min à temperatura ambiente e, então, centrifugados a 12000 g (10 min a 4°C).

Para a lavagem do tRNA, os sobrenadantes foram descartados (vertidos) e o RNA precipitado (pellet) foi lavado com etanol 100% (1 mL/mL de Trizol) e posteriormente centrifugado a 7600 g (5 min, 4°C). Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados (vertidos) e o pellet foi lavado com 1mL de etanol 75 % [diluído em água tratada com dietil-pirocarborato (DEPC) 0,01 % e inativada em autoclave]. Posteriormente, foi realizada nova centrifugação a 7600 g (5 min, 4°C), sendo os sobrenadantes novamente desprezados. Os tubos foram ainda deixados por 10 min a temperatura ambiente para total secagem do pellet, dando-se início à digestão das amostras com DNase I.

Para a digestão do DNA, os pellets secos foram ressuspensos em 43,5 µL de água DEPC inativa 0,01%. Posteriormente foram adicionados 6,5 µL do mix para digestão do DNA (5 µL do Tampão 10X, 0,5 µL de inibidor de RNase e 1 µL de DNase I – Invitrogen Brasil LTDA) sendo o volume final de 50 µL. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C por 15 min. Posteriormente, foi adicionado 1 µL de solução de parada (EDTA 25 mM) e em seguida submetido a re-extração do tRNA.

Para a re-extração do tRNA foram adicionados 50 µL de água DEPC inativa 0,01 % às amostras previamente submetidas ao ensaio de digestão do DNA, posteriormente, adicionados 200 µL da mistura fenol saturado em tampão (Invitrogen Brasil LTDA) / clorofórmio 1:1 e, após agitação por inversão, foram incubados por 2 -

3 min a temperatura ambiente, por fim, as amostras foram centrifugadas a 12000 g (15 min a 4 °C). A seguir, a fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo e a esta foram adicionados 200 µL de isopropanol 100% (para nova precipitação do RNA).

Após agitação por 15 seg e incubação por 10 min a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12000 g (10 min a 4°C), sendo o sobrenadante, então, descartado (vertido). Na sequência, 500 µL de etanol 100% foram adicionados, as amostras centrifugadas a 7600 g, (5min, 4°C) (para lavagem do pellet) e o sobrenadante foi novamente descartado (vertido). Foram adicionados então, 500 µL de etanol 75% (para lavagem do pellet) precedendo nova centrifugação a 7600 g, (5min, 4°C), bem como nova remoção do sobrenadante, adicionando-se por fim 500 µL de etanol 75% e congelando-se as amostras a – 20°C.

Para a quantificação do tRNA, as amostras contendo etanol 75% foram centrifugadas e o pellet de tRNA, seco. Posteriormente, o pellet de tRNA foi ressuspenso em volume adequado (≈ 20-30 µL) de água DEPC inativa 0,01%. As absorbâncias foram então medidas a 260 nm em espectrofotômetro (Eppendorf BioPhotometer – Eppendorf, Califórnia, EUA), sendo as concentrações de tRNA calculadas considerando a relação 1 AU = 40 µg/ mL, conforme a fórmula:

$$[\text{RNA } \mu\text{g/ mL}] = \text{Abs} \times \text{Fator de diluição} \times 40$$

Foram consideradas adequadas aquelas razões $260^{\text{RNA}}/280^{\text{PROT}}$ entre 1,8 e 2,0.

A integridade do tRNA isolado foi verificada através da eletroforese em gel de agarose 1% diluído em tampão TRIS acetato EDTA, contendo 2 µL/ 100 mL de brometo de etídio (0,5 µg/mL), Invitrogen Brasil LTDA, aplicando-se em cada poço (“lane”), 5 µL de uma solução contendo: 0,5 µL de amostra de RNA; 3,5 µL de H₂O DEPC 0,01% e 1 µL de tampão de amostra (contendo glicerol 50 %, azul de bromofenol 0,25% e 1mM de EDTA pH 8,0), fixando-se uma voltagem de 70 V por aproximadamente 1 h (até correr 2/3 do gel).

Posteriormente, os géis foram revelados sob luz ultravioleta (UV) e as imagens foram capturadas com detector de imagem Chime-Imager 5500- Alpha innotech Corporation.

O tempo de exposição foi ajustado pela autoexposição do aparelho (exposição normal para saturação da imagem em torno de alguns milissegundos). Por fim, foram visualizadas as bandas 28 S e 18 S, indicadoras da integridade do RNA.

Cuidadosamente, 4 µg de tRNA (amostra) foram avolumados para 10 µL de H₂O DEPC inativa 0,01%. Esta solução foi então aquecida a 65 °C por 5 min, seguida por choque térmico em gelo. A esta solução foi adicionado 10 µL de um mix contendo 1 µL de oligo dT (0,5 µg/ µL – Invitrogen Brasil LTDA); 1 µL da mistura de trifosfato de desoxinucleotídeos (dNTPs), a saber – 10 mM de dATP, 10 mM de dTTP, 10 mM de dCTP e 10 mM de dGTP – Invitrogen Brasil LTDA; 4 µL de tampão de reação (5 x first strand buffer), 2 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de RNase OUT (40 U/ µL) e, por último, 1 µL da enzima Superscript II (200 U/ µL). A fim de assegurar a ausência de DNA na amostra, foram utilizados controles negativo da reação RT, consistindo de “pool” de RNAs contendo todos os reagentes citados anteriormente com omissão da Superscript II.

A mistura foi posteriormente homogeneizada e incubada a 42°C durante 50 min em banho-maria, sendo posteriormente incubada a 70°C durante 15 min em banho-maria para inativação da enzima. As amostras foram, então, mantidas a -20°C até serem submetidas à reação em cadeia de polimerase (PCR).

A reação em cadeia de polimerase em tempo real (real time PCR) foi realizada em um volume final de 12,5 µL contendo 1 µL de cDNA (transcrito anteriormente), 0,5 µL do oligonucleotídeo sense (10⁻⁵ M), 0,5 µL do oligonucleotídeo antisense (10⁻⁵ M); 4,25 µL de H₂O DEPC autoclava e por fim 6,25 µL de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), o qual contém Platinum® Taq DNA polimerase, corante SYBR® green I, TRIS-HCl, KCl, 6 mM MgCl₂, 400 µM dGTP, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 800 µM dUTP, uracil DNA glicosilase (UDG) e agentes estabilizadores.

Os oligonucleotídeos para o PAR-2 foram extraídos do GenBank e desenhados com o auxílio do software Primer3. As seqüências geradas no programa Primer3 também foram analisadas no Blast quanto à especificidade e tamanho do fragmento. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do cDNA, bem como o número de acesso ao GeneBank são apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Sequência de Primers utilizados no PCR em tempo real

GENE	Sequências sense (S) e antisense (AS)	Nº de acesso ao GeneBank	Tamanho do fragmento
GAPDH (S)	5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3'	NM_002046	80pb
GAPDH (AS)	5'- ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'		
PAR-2 (S)	5'- TGCTAGCAGCCTCTCTCTCC -3'	NM_053897.2	92pb
PAR-2 (AS)	5'- TGTGCCATCAACCTTACCAA -3'		
Gingipaína (S)	5'-CCTACGTGTACGGACAGAGCTATA-3'	NC_010729	70pb
Gingipaína (AS)	5'-AGGATCGCTCAGCGTAGCATT-3'		
16S Ribossomal (S)	5'-TCGGTATTGAGGAAGGTTGG-3'	NC_015571	86pb
16S Ribossomal (AS)	5'-CTGCTGGCACGGAGTTAG-3'		
S = sense AS = anti-sense			

As condições do PCR utilizadas para amplificar o PAR-2 foram: 2 min a 50° C, 2 min a 95° C; seguindo-se 40 ciclos na seguinte sequência: 15 s a 95° C, 1 min a temperatura de anelamento, e 20 s a 72° C. Todas as reações foram realizadas e analisadas usando o sistema Corbett Research (Corbett Life Sciences, Austrália). A expressão gênica foi quantificada utilizando o cálculo do ΔC_t ("cycle threshold"). A expressão do gene GAPDH foi utilizada como controle interno (housekeeping) para normalização das amostras. O resultado foi expresso em unidades arbitrárias referente à variação da taxa de indução (fold increase) em relação ao grupo controle.

A análise da expressão dos produtos da reação em cadeia de polimerase em tempo real (real time PCR) foi realizada através da especificidade da reação com SYBR green confirmada pela curva de dissociação. A linearidade e eficiência do teste foram avaliadas previamente através da curva de diluição da amostra, pois se partindo do princípio que os "amplicons" duplicam-se a cada ciclo é possível determinar a eficiência de cada reação calculando-se a inclinação (slope) da curva padrão. As reações foram consideradas aceitáveis quando apresentavam inclinação e eficiência próximas ao ótimo (-3,322 e 1 respectivamente). Este procedimento indica a eficiência dos oligonucleotídeos e a melhor diluição do produto de RT a ser utilizada nos ensaios.

4.6 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar as médias entre os grupos. No caso em que foi encontrada diferença entre os grupos, comparações post hoc entre dois grupos foram analisadas com o teste de Tukey-Kramer. Para as médias dos índices de IS e IPV foi utilizado o teste de chi-quadrado, e para se comparar as médias pré e pós tratamento o teste T pareado. A correlação de Pearson foi usada para testar as correlações entre a expressão gênica de PAR-2 e PCS, NCI e expressão gênica de gingipaina.

As análises e os gráficos foram feitos utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Um valor de $p < 0,05$

foi considerado estatisticamente significativo. Os dados estão expressos em médias $\pm$ desvio padrão (D.P.).

5 RESULTADOS

Foram examinados 429 pacientes, destes selecionamos 19 pacientes para cada grupo da pesquisa, os quais se encaixavam nos critérios do estudo. No decorrer do estudo 3 pacientes do grupo de PS se perderam devido ao não retorno.

Os resultados da análise demográfica mostraram similaridade na distribuição dos gêneros e idades, sendo nove pacientes do sexo feminino e dez do sexo masculino, com idade entre 31 e 58 anos (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Dados demográficos

	Grupo controle	Periodontite Moderada	Periodontite Severa
N	19	19	16
Gênero	10M/9F	10M/9F	9M/7F
Idade (anos)	42,5±7,92	43,74±9,78	43,42 ± 7,00

5.1 Parâmetros Clínicos

No início ocorreu diferença estatística em todos os parâmetros clínicos entre os três grupos avaliados: controle, PM e PS. A análise estatística apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para todos os parâmetros clínicos quando comparamos os grupos com periodontite crônica (PM e PS) com o grupo C. Entre os grupos PM e PS apenas os parâmetros PCS e IPV apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

Após o tratamento periodontal não cirúrgico dos grupos PM e PS observamos redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao início do estudo, nos parâmetros IP, SS e PCS (Tabela 5.2). O parâmetro NCI apresentou melhora significativa ($p < 0,05$) apenas no grupo pós terapia PS. Contudo, em comparação

com o grupo C os parâmetros PCS e NCI pós terapia periodontal continuaram apresentando diferença estatística tanto para o grupo PM quanto para o grupo PS.

Tabela 5.2 - Média e Desvio Padrão dos parâmetros clínicos periodontais do grupo controle com periodontite crônica no baseline e apos terapia periodontal não-cirúrgica da boca toda

	Grupo Controle	Periodontite Moderada (baseline)	Periodontite Moderada (pós-terapia)	Periodontite Severa (baseline)	Periodontite Severa (pós- terapia)
PCS (mm)	1,84±0,28	2,79±0,41 a	2,22 ± 0,29 a,b	3,30 ± 0,7 a,b,c	2,33 ± 0,31 a,b,d
NCI (mm)	2,11±0,37	3,51±0,57 a	3,15 ± 0,65 a	4,14 ± 1,03 a,c	3,26 ± 0,95 a,d
IS (%)	3,33±2,89	55,87±20,83 a	16,47 ± 27,00 b	42,14 ± 20,09 a,c	11,14 ± 4,45 b,d
IPV (%)	11,88±10,78	86,85±14,95 a	25,91 ± 14,95 b	63,33 ± 23,0a,b,c	15,47 ± 7,65 b,c,d

PCS, profundidade clínica de sondagem; NCI, nível clínico de inserção; SS, sangramento à sondagem; IP, índice de placa

a – estatisticamente diferente ($p<0,05$) do grupo controle

b – estatisticamente diferente ($p<0,05$) do grupo periodontite moderada antes

c – estatisticamente diferente ($p<0,05$) do grupo periodontite moderada após

d – estatisticamente diferente ($p<0,05$) do grupo periodontite severa antes

A tabela 5.3 mostra que os parâmetros clínicos periodontais (PCS,NCI,SS e IP) dos sítios coletados foram estatisticamente superiores ($p<0,05$) em comparação com parâmetros dos sítios do grupo controle. Sítios tratados dos grupos com periodontite crônica (PM e PS) apresentaram diminuições significativas nos parâmetros PCS, NCI, SS e IP, em relação aos sítios doentes no baseline (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Média e Desvio Padrão dos parâmetros clínicos periodontais dos sítios coletados do grupo controle com periodontite crônica no baseline e após terapia periodontal não-cirúrgica da boca toda

	Grupo Controle	Periodontite Moderada (antes)	Periodontite Moderada (depois)	Periodontite Severa (antes)	Periodontite Severa (depois)
PCS (mm)	2,15 ± 0,47	5,05 ± 0,81 a	3,19 ± 0,87 a,b	6,26 ± 1,17 a,b,c	3,13 ± 0,72 a,b,d
NCI (mm)	2,24 ± 0,53	6,13 ± 1,15 a	4,39 ± 1,15 a,b	7,01 ± 1,44 a	4,48 ± 1,05 a,d
IS (%)	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00 a	26,32 ± 35,82 a,b	73,68 ± 28,23 a,c	21,31 ± 16,90 a,d
IPV(%)	2,21 ± 6,61	91,55 ± 13,95 a	33,40 ± 32,07 a,b	49,10 ± 30,50 a,b,c	7,73 ± 13,45 a,b,d

PCS, profundidade clínica de sondagem; NCI, nível clínico de inserção; SS, sangramento à sondagem; IP, índice de placa

a – estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do grupo controle

b – estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do grupo periodontite moderada antes

c – estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do grupo periodontite moderada após

d – estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do grupo periodontite severa antes

5.2 Análise da Expressão de PAR-2 no fluido gengival

A expressão gênica de PAR-2 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica severa (PS) foi significativamente maior ($p < 0,05$) em relação aos pacientes com saúde periodontal (3 vezes maior) e em relação aos pacientes com periodontite crônica moderada (2 vezes maior). Vide figura 5.1.

O tratamento periodontal não-cirúrgico resultou em diminuição significativa ($p < 0,05$) da expressão gênica de PAR-2 no fluido gengival de pacientes de ambos os grupos avaliados, PM e PS.

Figura 5.1 - Médias e Desvio Padrão da expressão gênica de PAR-2 no fluido gengival do grupo controle e dos grupos com periodontite crônica no baseline e pós-terapia periodontal não cirúrgico

*Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle;

•Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao baseline do grupo periodontite crônica moderada;

°Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao baseline do grupo periodontite crônica severa;

Houve uma correlação positiva entre a expressão gênica de PAR-2 no fluido gengival e os valores de média de PCS ($r=0,64$; $p<0,01$) e média de NCI ($r=0,40$; $p<0,01$)

5.3 Análise da expressão gênica de gingipaína no fluido gengival

A expressão gênica de gingipaína foi significativamente menor ($p<0,05$) nos pacientes controle em relação aos pacientes com periodontite crônica. Além disso, o grupo PS apresentou uma maior expressão de gingipaína em relação ao grupo PM ($p<0,05$)(Figura 5.2).

Após terapia periodontal, a expressão gênica de gingipaína diminuiu em ambos os grupos com periodontite crônica (PM e PS; $p<0,05$). Houve uma

correlação positiva entre a expressão gênica de gingipaína e a expressão de PAR-2 no fluido gengival ($r=0,41$; $p<0,01$)(Figura 5.2).

Figura 5.2 - Médias e Desvio Padrão da expressão gênica da protease bacteriana gingipaína, no fluido gengival no grupo controle e nos grupos com periodontite crônica no baseline e terapia periodontal não-cirúrgica

*Diferença estatisticamente significativa ($P<0.05$) em relação ao grupo controle;

•Diferença estatisticamente significativa ($P<0.05$) em relação ao baseline do grupo periodontite crônica moderada;

°Diferença estatisticamente significativa ($P<0.05$) em relação ao baseline do grupo periodontite crônica severa;

6 DISCUSSÃO

O presente estudo verificou a expressão de PAR-2, e da protease bacteriana gingipaina no fluido gengival de pacientes portadores da doença periodontal mais predominante na população, a periodontite crônica (Susin et al., 2011; Eke et al., 2012; Jimenez et al., 2014). O principal achado do presente estudo foi a correlação positiva entre a severidade da doença periodontal e a expressão de PAR-2 no fluido gengival. Pacientes com periodontite crônica severa apresentaram uma expressão de PAR-2 duas vezes maior em relação aos pacientes com periodontite crônica moderada, e quatro vezes maior em relação aos pacientes periodontalmente saudáveis. Estes resultados concordam com o estudo anterior de Holzhausen et al. (2010) o qual encontrou uma maior expressão do receptor em sítios periodontais mais profundos.

O tratamento periodontal não-cirúrgico reduziu a expressão de PAR-2 nos pacientes com periodontite crônica, sendo que essa redução foi associada com a melhora dos parâmetros clínicos relacionados a inflamação, concordando com o estudo de Euzébio-Alves et al. (2013). Esse último estudo verificou ainda a associação da diminuição da expressão de PAR-2 após tratamento com a diminuição de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, IL-8, TNF- α , MMP-2, MMP-8, HGF, e VEGF.

Considerando-se que a análise da expressão de PAR-2 no presente estudo foi realizada a partir de amostras do fluido gengival, a expressão encontrada pode refletir a expressão presente em células deste ambiente, tais como linfócitos, neutrófilos, mastócitos e células epiteliais orais (Bohm et al., 1996; Nysted et al., 1996; Loubakos et al., 1998; Abraham et al., 2000; Loubakos et al., 2001a, 2001b; Ossovskaya; Bunnett, 2003). Sabe-se que a ativação do receptor PAR-2 nestas células pode levar a secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , PGE₂, e MMP-9 (Loubakos et al., 2001a, 2001b; Shpacovitch et al., 2004; Ossovskaya; Bunnett, 2003; Holzhausen et al., 2006; Lee et al., 2007; Moraes et al., 2008). Além disso, podemos sugerir também que o aumento da expressão do receptor no fluido gengival pode ser resultante de uma

maior presença de neutrófilos e células epiteliais nos sítios periodontais doentes comparados aos sítios saudáveis (Euzébio-Alves et al. 2013).

No presente estudo mostrou-se uma correlação positiva entre a expressão do receptor PAR-2 e a expressão da protease bacteriana gengivaína, produzida pela Pg, com papel reconhecido na ativação de PAR-2 (Lourbakos et al. 1998, 2001a, 2001b). Euzébio-Alves et al. (2013) também verificou uma associação positiva entre a expressão de PAR-2 e a expressão da gengivaína em pacientes com periodontite crônica moderada. Além disso, no estudo de Fagundes et al. (2011) foi encontrada uma associação positiva entre uma maior presença de Pg e uma maior expressão de PAR-2. Da mesma forma, outros trabalhos associaram a presença de microorganismos com uma maior expressão de PAR-2: em células epiteliais gástricas na presença de *Helicobacter pylori* (Kajikawa et al., 2007), em neutrófilos humanos na presença de *Salmonella typhimurium* (St-Onge et al., 2010), nas vias aéreas de ratos infectados com vírus da gripe (Lan et al., 2004), e em células epiteliais infectadas por *Cryptosporidium parvum* (Yang et al., 2009).

Devemos destacar que as análises realizadas no presente estudo não tem o intuito de desmistificar as cascatas de ativação em que o PAR-2 está envolvido, ou qualquer outra interação que ocorra entre a gengivaína e o hospedeiro e/ou outros agentes da doença periodontal. O escopo do presente trabalho objetivou a avaliação da associação dos diferentes graus de severidade da periodontite crônica com a expressão do receptor PAR-2. Trabalhos futuros poderão esclarecer melhor os mecanismos inflamatórios associados com a ativação de PAR-2 na doença periodontal através do uso de agentes medicamentosos que interajam com o receptor.

Dessa forma, no presente estudo nós demonstramos que a severidade da doença periodontal afeta a expressão gênica de PAR-2 e de seu principal possível ativador, a gengivaína, no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, demonstramos que a severidade da doença periodontal afeta a expressão do receptor PAR-2 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica.

Dessa forma, dentro dos limites do presente estudo, podemos concluir que:

1) A expressão de PAR-2 se mostrou estatisticamente mais elevada no grupo de pacientes com periodontite crônica severa, quando comparada com pacientes com periodontite crônica moderada e pacientes periodontalmente saudáveis.

2) O tratamento periodontal não cirúrgico reduziu a expressão de PAR-2 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica severa.

3) A expressão de PAR-2 no fluido gengival apresentou uma associação positiva com a expressão da protease bacteriana gingipaina, em pacientes com periodontite crônica severa.

REFERÊNCIAS¹

- Abraham LA, Chinni C, Jenkins AL, Loubakos A, Ally N, Pike RN, Mackie EJ. Expression of protease-activated receptor-2 by osteoblasts. *Bone*. 2000 Jan;26(1):7-14.
- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975;25(4):229-35.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):1-6.
- Bohm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Anderson AD, Connolly A, Kahn M, Nelken NA, Coughlin SR, Payan DG, Bunnett NW. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J*. 1996 Mar;15;314(Pt 3):1009-16.
- Corvera CU, Dery O, McConalogue K, Bohm SK, Khltin LM, Caughey GH, Payan DG, Bunnett NW. Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J Clin Invest*. 1997;100(6):1383-93.
- Coughlin SR, Vu TKH, Hung DT, Wheaton VI. Characterization of functional thrombin receptor. *J Clin Invest*. 1992;89:351-5.
- Déry O, Thoma MS, Wong H, Grady EF, Bunnett NW. Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and beta-arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. beta-Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. *J Biol Chem*. 1999 Jun;25;274(26):18524-35.
- Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*. 2012 Oct;91(10):914-20.
- Euzébio-Alves VT, Silva HAB, França BN, Eichler RS, Saraiva L, Carvalho MHC, Holzhausen M. Periodontal treatment down-regulates protease-activated receptor-2 in human gingival crevicular fluid cells. *Infect Immun*. 2013;81(12):4399-407.

¹ De acordo com estilo Vancouver.

Fagundes JAG, Monoo LD, Alves VTE, Pannuti CM, Cortelli SC, Cortelli JR, Holzhausen M. *Porphyromonas gingivalis* is associated with protease-activated receptor-2 upregulation in chronic periodontitis. J Periodontol. 2011;82(11):1596-601.

Glavind L, Loe H. Errors in the clinica assessment on periodontal destruction. J Periodontal Res. 1967;2:180-4.

Greenstein G. The role of bleeding upon Probing in the diagnosis of periodontal disease. J Periodontol. 1981(12);55:684-8.

Holzhausen M, Spolidoro LC, Vergnolle N. Protease-activated receptor-2(PAR2) agonist causes periodontitis in rats. J Dent Res. 2005;84:154.

Holzhausen M, Spolidoro LC, Ellen RP, Jobin MC, Steinhoff M, Andrade-Gordon P, Vergnolle N. Protease-activated receptor-2 activation: A major role I the pathogenesis of *Porphyromonas gingivalis* infection. AJP. 2006;168(4):1189-99.

Holzhausen M, Cortelli JR, Silva VA, Franco GCN, Cortelli SC, Vergnolle N. Protease-activated receptor-2 (PAR2) in human periodontitis. J Dent Res. 2010;89(9):948-53.

Howells GL, Macey MG, Chinni C, Hou L, Fox MT, Harriott P, Stone RS. Proteinase-activated receptor-2:expression by human neutrophils. J Cell Sci. 1997;110:881-7.

Hoxie JA, Ahuja M, Belmonte E, Pizarro S, Parton R, Brass LF. Internalization and recycling of activated thrombin receptors. J Bio Chemis. 1993;268;18:12756-63.

Ishii K, Chen Ji, Ishii M, Koch WJ, Freedman NJ, Lefkowitz RJ, Coughlin SR. Inhibition of thrombin receptor signaling by a g-protein coupled receptor kinase. J Bio Chem. 1994;269;2:1125-30.

Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. Nature. 1997;386:502-6.

Jiménez MC, Sanders AE, Mauriello SM, Kaste LM, Beck JD. Prevalence of periodontitis according to Hispanic or Latino background among study participants of the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. J Am Dent Assoc. 2014 Aug;145(8):805-16.

Kajikawa H, Yoshida N, Katada K, Hirayama F, Handa O, Kokura S, Naito Y, Yoshikawa T. *Helicobacter pylori* activates gastric epithelial cells to produce interleukin-8 via protease-activated receptor 2. *Digestion* 2007; 76:248-255.

Knight DA, Lim S, Scaffidi AK, Roche N, Chung KF, Stewart GA, Thompson PJ. Protease-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Nov;108(5):797-803.

Lan RS, Stewart GA, Goldie RG, Henry PJ. Altered expression and in vivo lung function of protease-activated receptors during influenza A virus infection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286:L388-L398.

Lee HM, Kim HY, Kang HJ, Woo JS, Chae SW, Lee SH. Up-regulation of protease-activated receptor 2 in allergic rhinitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007; 116:554-558.

Lim J, Iyer A, Liu L, Suen JY, Lohman RJ, Seow V, Yau MK, Brown L, Fairlie DP. Diet-induced obesity, adipose inflammation, and metabolic dysfunction correlating with PAR2 expression are attenuated by PAR2 antagonism. *FASEB J*. 2013 Dec;27(12):4757-67.

Lourbakos A, Chinni C, Thompson P, Potempa J, Travis J, Mackie EJ, Pike RN. Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*. *FEBS Letters*. 1998;435:45-48.

Lourbakos A, Potempa J, Travis J, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, Santulli R, Mackie EJ, Pike RN. Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun*. 2001a;69(8):5121.

Lourbakos A, Yuan YP, Jenkins AL, Travis J, Andrade-Gordon P, Santulli R, Potempa J, Pike RN. Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. *Blood*. 2001b;97:3790-7.

Lundy FT, About I, Curtis TM, McGahon MK, Linden GJ, Irwin CR, El Karim IA. PAR-2 regulates dental pulp inflammation associated with caries. *J Dent Res*. 2010 Jul;89(7):684-8.

Molino M, Barnathan ES, Numerof R, Clark J, Dreyer M, Cumashi A, Hoxie JA, Schechter N, Woolkalis M, Brass LF. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem*. 1997;272:4043-9.

Moraes TJ, Martin R, Plumb JD, Vachon E, Cameron CM, Danesh A. Role of PAR2 in murine pulmonary pseudomonal infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294:L368-L377.

Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases:a review. *Oral Diseases*. 2012;12:236-43.

Noorbakhsh F, Tsutsui S, Vergnolle N, Boven LA, Shariat N, Vodjgani M, Warren KG, Andrade-Gordon P, Hollenberg MD, Power C. Proteinase-activated receptor 2 modulates neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2006 Feb 20;203(2):425-35.

Nysted S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 1994 91:9208-12.

Nysted S, Larsson AK, Aberg H, Sundelin J. The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. *J Bio Chem*. 1995a;270(11):5950-55.

Nysted S, Emilsson K, Larsson AK, Strombeck B, Sundelin J. Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur J Biochem*. 1995b;232:84-9.

Nysted S, Ramakrishnan V, Sundelin J. The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells: Comparison with the thrombin receptor. *J Biol Chem*. 1996;271:14910-5.

Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease activated receptor: Contribution to Physiology and Disease. *Physiol Rev*. 2004 ;4:579-621.

Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, Schlesinger Y, Pages G, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyssegur J, Obberghen-Schilling EV. cDNA cloning and expression of a hamster α -thrombin receptor coupled to Ca^{2+} mobilization. *FEBS* 1991;288(1/2):123-8.

Shpacovitch VM, Varga G, Strey A, Gunzer M, Mooren F, Buddenkotte J, Vergnolle N, Sommerhoff CP, Grabbe S, Gerke V, Homey B, Hollenberg M, Luger TA, Steinhoff M. Agonists of proteinase-activated receptor-2 modulate human neutrophil cytokine secretion, expression of cell adhesion molecules, and migration within 3-D collagen lattices. *J Leukoc Biol.* 2004 Aug;76(2):388-98.

St-Onge M, Lagarde S, Laflamme C, Rollet-Labelle E, Marois L, Naccache PH, Pouliot M. Proteinase- activated receptor-2 up-regulation by Fcγ-receptor activation in human neutrophils. *FASEB J* 2010; 24:2116-2125.

Susin C, Haas AN, Valle PM, Oppermann RV, Albandar JM. Prevalence and risk indicators for chronic periodontitis in adolescents and young adults in south Brazil. *J Clin Periodontol.* 2011 Apr;38(4):326-33.

Uehara A, Naito M, Imamura T, Potempa J, Travis J, Nakayama K, Takada H. Dual regulation of interleukin-8 production in human oral epithelial cells upon stimulation with gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *J Med Microbiol.* 2008;57:500-7.

Vergnolle N, Hollenberg MD, Sharkey KA, Wallace JL. Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2(PAR2)-activating peptides in the rat paw. *Br J Pharm.* 1999;127:1083-90.

Vergnolle N, Hollenberg MD, Wallace JL. Pro- and anti-inflammatory actions of thrombin: a distinct receptor proteinase-activated receptor-1(PAR1). *Br J Pharm.* 1999;126:1262-8.

Vergnolle N, Wallace JL, Bunnett NW, Hollenberg MD. Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol Sci.* 2001a Mar;22(3)

Vergnolle N, Bunnett NW, Sharkey KA, Brussee V, Compton SJ, Grady EF, Cirino G, Gerard N, Basbaum AI, Andrade-Gordon P, Hollenberg MD, Wallace JL. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. *Nat Med.* 2001b Jul;7(7):821-6.

Vu TKH, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 1991;64:1057-68.

Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, Bolger A, Cabell CH, Takahashi M, Baltimore RS, Newburger JW, Strom BL, Tani LY, Gerber M, Bonow RO, Pallasch T, Shulman ST, Rowley AH, Burns JC, Ferrieri P, Gardner T, Goff D, Durack DT. Prevention of infective endocarditis: Guidelines from the American Heart Association. *J Am Dent Ass.* 2007;138:739-60.

Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbet T, Davie EW, Foster DC. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:6642-6.

Yang YL, Serrano MG, Sheoran AS, Manque PA, Buck GA, Widmer G. Over-expression and localization of a host protein on the membrane of *Cryptosporidium parvum* infected epithelial cells. *Mol Biochem Parasitol* 2009;168:95-101.

Yau MK, Liu L, Fairlie DP. Toward drugs for protease-activated receptor 2 (PAR2). *J Med Chem.* 2013 Oct 10;56(19):7477-97.

Yeoh S, Church M, Lackie P, McGill J, Mota M, Hossain P. Increased conjunctival expression of protease activated receptor 2 (PAR-2) in seasonal allergic conjunctivitis: a role for abnormal conjunctival epithelial permeability in disease pathogenesis? *Br J Ophthalmol.* 2011 Sep;95(9):1304-8.

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, por favor, assine ao final deste documento, elaborado em duas vias de um só teor. Uma das vias é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa em participar do presente estudo, você não será penalizado(a) de forma alguma.

TÍTULO: “ESTUDO DO EFEITO DA SEVERIDADE DA DOENÇA PERIODONTAL SOBRE A EXPRESSÃO DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE DO TIPO 2 (PAR-2) EM PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA SEVERA ANTES E APÓS O TRATAMENTO PERIODONTAL”.

RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Marinella Holzhausen.

JUSTIFICATIVA: A doença periodontal (gengival) é uma inflamação que deixa a gengiva inchada, vermelha e, em alguns casos, pode causar o amolecimento e perda do dente. Essa é uma doença muito comum, pois oito em cada dez adultos brasileiros apresentam alguma forma de doença da gengiva. A inflamação da gengiva é causada por bactérias (germes) da boca que vivem ao redor dos dentes e gengiva. Estas bactérias produzem algumas substâncias que, de alguma forma, irritam a gengiva.

O objetivo deste presente estudo é avaliar se a irritação da gengiva acontece por causa da união das substâncias produzidas pelas bactérias da boca com uma proteína da gengiva chamada receptor tipo 2 ativado por protease.

Neste estudo serão examinados pacientes adultos, entre 20 e 45 anos de idade, para saber se apresentam doença da gengiva. Também será avaliado se estes pacientes têm na boca uma proteína chamada receptor tipo 2 ativado por protease. Todos os dentes serão examinados e será coletado um pouco de líquido da gengiva com uma cone de papel. O exame leva aproximadamente 20 minutos, não dói e não causa qualquer problema para a pessoa. Se o paciente não quiser participar deste estudo será feito apenas um exame mais rápido para ver que tipo de tratamento dentário a pessoa precisa. Se o senhor(a) quiser participar, mas durante o exame não gostar de alguma coisa é só falar com o dentista que ele irá parar na mesma

hora. O tratamento dentário será realizado mesmo que o senhor(a) não queira participar do trabalho.

CUSTO E PAGAMENTO: Não haverá nenhum custo para participar deste trabalho. Todo o material necessário será fornecido pelos professores.

SIGILO: Caso você aceite participar deste estudo será feito um cadastro numa ficha que pertence ao professor responsável pela pesquisa. Será mantido segredo do seu nome e não será divulgado o seu nome em trabalhos apresentados na faculdade, congressos etc.

INDENIZAÇÃO E DANOS: Você deve saber que a coleta do líquido da gengiva com uma cone de papel não vai causar nenhum dano a você, assim, não haverá qualquer tipo de pagamento pelo exame.

CONSENTIMENTO VOLUNTÁRIO: Você deve ter entendido tudo o que leu. Uma cópia deste Termo será entregue para você e outra ficará arquivada com o professor responsável. A assinatura abaixo significa que você concorda em participar deste estudo.

Em qualquer etapa do estudo, o Sr.(a) poderá contatar os profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal pesquisador é a Profa Dra. Marinella Holzhausen que pode ser encontrada na Faculdade de Odontologia da USP, localizada na Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária, (11) 3091-7833.

Se o sr.(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, poderá entrar em contato com o comitê de ética em pesquisa da FOUSP: Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária.

DECLARAÇÃO

Eu,.....

Nacionalidade.....,

Estado civil.....

Profissão....., nascido (a) em / / Na cidade de....., Estado de.....

Portador da cédula de identidade

Número.....

CPF.....,

Residente a.....

Declaro ter sido inteiramente esclarecido(a) sobre o estudo e ter lido e entendido o termo que estou assinando abaixo.

Assinatura do paciente

Assinatura do responsável

São Paulo, _____ de _____ 201_.

APÊNDICE B – Ficha de Anamnese

<i>FICHA DE ANAMNESE</i>				
Paciente nº		Data do exame / /		
Nome -				
Endereço -				
Cidade	Cep	Fone		
Ocupação -				
Data nascimento	/	/	Idade	Gênero (F) (M)
Está sob tratamento médico?				
Qual tratamento?				
Qual médico?		Fone		
Há quanto tempo?				
Está tomando alguma medicação?		Há quanto tempo?		
Qual?				
Já foi submetido a tratamento periodontal?				
Qual tipo?				
Há quanto tempo?				
Fez uso de antibiótico nos últimos 6 meses?				
Qual?		Por quê?		
Possui algum problema de saúde como:				
Diabete	()	Alteração PA	()	Problemas sangüíneos ()
Anemia	()	Neutropenia	()	Problemas cardíacos ()
Epilepsia	()	Problema hormonal	()	Doença infecciosa ()
Hepatite	()	Problemas SNC	()	Doença contagiosa ()
SIDA	()	Problemas renais	()	Doença auto-imune ()
OBS:				
Está grávida?		Quantos meses?		
É fumante?	_____	Cigarros/ dia	Há quanto tempo?	
Obs:				

ANEXO B – Modelo de ficha clínica para registro do Índice de Placa Visível

ÍNDICE DE PLACA

INICIAL	Data:
---------	-------

Maxila

17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
V													
M													
L													
D													

Mandíbula

47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
V													
M													
L													
D													

FINAL

FINAL	Data:
-------	-------

Maxila

17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
V													
M													
L													
D													

Mandíbula

47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
V													
M													
L													
D													

n DENTES AUSENTES

SUPERF	IPF/IPI	#DIV/0!	#DIV/0!
IP INICIAL	#DIV/0!	% de Red.	#DIV/0!
IP FINAL	#DIV/0!		

[illegible]

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FOUSP)

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****Comitê de Ética em Pesquisa****PARECER DE APROVAÇÃO
FR – 337902
Protocolo 106/2010**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Efeito da terapia periodontal sobre a expressão do receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR-2) em pacientes com periodontite crônica**", de responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Marinella Holzhausen.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 01 de julho de 2010.

Profa. Dra. Marcia Turolia Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP