IEDA SANTOS ABREU

**Influência do diabetes *mellitus* do tipo 2 na expressão dos
receptores ativados por protease do tipo 1 (PAR₁) e do tipo 2 (PAR₂)
em pacientes com periodontite crônica**

São Paulo

2014

IEDA SANTOS ABREU

**Influência do diabetes *mellitus* do tipo 2 na expressão dos
receptores ativados por protease do tipo 1 (PAR₁) e do tipo 2 (PAR₂)
em pacientes com periodontite crônica**

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

Orientadora: 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-na-Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Abreu, Ieda Santos.

Influência do diabetes *mellitus* do tipo 2 na expressão dos receptores ativados por protease do tipo 1 (PAR₁) e do tipo 2 (PAR₂) em pacientes com periodontite crônica/ Ieda Santos Abreu; orientador Marinella Holzhausen Caldeira. -- São Paulo, 2014.

73 p. : fig., tab., graf.; 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. Diabetes Mellitus. 3. Reparação periodontal. I. Caldeira, Marinella Holzhausen. II. Título.

Abreu IS. Influência do diabetes *mellitus* do tipo 2 na expressão dos receptores ativados por protease do tipo 1 (PAR₁) e do tipo 2 (PAR₂) em pacientes com periodontite crônica. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovada em: / /2014

Banca Examinadora

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

Instituição: _____ Julgamento: _____

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

Instituição: _____ Julgamento: _____

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

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu amado filho **Felipe**, que sempre tão otimista me incentiva, torce por mim e vibra com minhas conquistas.

Ao **Sandro**, meu marido e companheiro de muitos anos, pelo carinho, apoio, incentivo e pela paciência em me ouvir e acalmar nas horas mais difíceis, tentando sempre me mostrar o lado bom das coisas.

Aos meus pais, **Abreu (in memoriam)** e **Cari**, meus amores, que sempre me ampararam em meus momentos mais difíceis. Mãe querida, meu porto seguro, te amo!

Às minhas amadas irmãs **Norma, Rosana e Ligia**, por serem tão especiais e por estarem ao meu lado a vida toda. Vocês são incríveis.

Aos meus sobrinhos **Bruno, Karina, Fernando e Martina**, pela alegria que são em minha vida. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira**, quem eu admiro e respeito muito, por ter me aceitado como sua aluna, acreditado em mim e principalmente pela competência e disposição com que me orientou. Serei sempre muito grata pela oportunidade. Muito obrigada!

Aos Professores da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da USP, **Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito, Prof. Dr. Claudio Mendes Pannuti, Prof. Dr. Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima, Prof. Dr. João Batista Cesar Neto, Profa. Dra. Luciana Saraiva, Prof. Dr. Marco Antônio Paupério Georgetti, Prof. Dr. Giorgio De Micheli, Profa. Dra. Marina Clemente Conde e Profa Dra. Cristina Cunha Villar**. Agradeço de coração por todos os ensinamentos e por estarem sempre disponíveis para me ajudar e esclarecer minhas dúvidas.

À querida **Vanessa Tubero Euzebio Alves**, que desde o primeiro dia me pegou pela mão e ensinou cada detalhe, com muito carinho e paciência.

À minha querida amiga **Profa Dra. Marilis do Valle Marques** pelo apoio e carinho.

À **Profa. Maria Helena Catteli de Camargo**, por abrir as portas do Laboratório de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-USP) para as análises laboratoriais.

Aos professores **Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima e Karin Fernandes de Sá** pelas contribuições durante meu exame de qualificação.

Ao querido **Henrique Aparecido Bueno da Silva**, que sempre esteve ao meu lado.

Aos colegas de pós-graduação **Adriana Foz, Ana Paula Sassa Benedete, Caio Cremonini, Carlos Eduardo Secco Mafra, Ecinele Rosa, Eder de Souza Martins, Hilana Artese, Lucas Macedo Batitucci Ambrósio, Mariana Rocha Guglielmetti, Mariana Sousa Rabelo, Rodrigo Nahas, Rodrigo Santos e Verônica Carvalho**. Foi um privilégio enorme ter conhecido vocês.

À **Márcia Maria dos Santos e Marília Camargo Gomes**, funcionárias da disciplina de Periodontia, que com muita paciência e carinho, sempre me ajudaram com os relatórios, prazos e com todo o resto que precisei.

À **Kátia e Rosângela**, do Departamento de pós-graduação da FOU SP, e às bibliotecárias da FOU SP **Glauci, Cláudia, e Vânia** pelas orientações e ajuda sempre!

Ao **Marcos**, do xerox da FOU SP, que foi um anjo quando mais precisei.

E meu muito, mas muito obrigada aos meus queridíssimos colegas e amigos de turma de mestrado, **Daniela Takahashi, Débora Massarente, Henrique Fukushima, Michelle de Franco Rodrigues, Priscila Vivas, Stefania Possamai e Vanessa Almeida**, pelas aulas, pelos seminários, pelas viagens aos Congressos, pelas risadas, pelas conversas, enfim por tudo. Vocês são pra lá de especiais. Tenho certeza de que se não tivesse o carinho e amizade de vocês, esta jornada não teria sido tão especial. Vocês moram no meu coração.

À **FAPESP** e à **CAPES** por terem apoiado este trabalho.

RESUMO

Abreu IS. Influência do diabetes *mellitus* do tipo 2 na expressão dos receptores ativados por protease do tipo 1 (PAR₁) e do tipo 2 (PAR₂) em pacientes com periodontite crônica [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

O receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR₁) parece estar associado ao reparo periodontal, enquanto o tipo 2 (PAR₂) com a inflamação periodontal. Esses receptores podem ser ativados pelas proteases gingipaina, uma protease secretada pela *Porphyromonas gingivalis*, um importante periodontopatógeno, e pela proteinase-3 de neutrófilos (P3), que é liberada por neutrófilos quando expostos a um estímulo inflamatório. Uma vez que o diabetes é reconhecido como um fator de risco importante para a doença periodontal, o objetivo deste estudo foi investigar a expressão de PAR₁ e de PAR₂ e de seus ativadores, gingipaina e P3 no fluido gengival (FG) de pacientes diabéticos com periodontite crônica, antes e após tratamento periodontal não cirúrgico. Amostras de FG e os parâmetros clínicos, como profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção (NCI), sangramento à sondagem (SS) e índice de placa (IP) foram coletados de pacientes sistemicamente saudáveis e de pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 2 (DMT2) com periodontite crônica, no baseline e após o tratamento periodontal não cirúrgico. As expressões gênicas de PAR₁, PAR₂, gingipaina e P3 no FG foram quantificadas por qPCR. Os parâmetros clínicos melhoraram significativamente após a terapia periodontal ($p < 0,01$). O diabetes levou ao aumento da expressão de PAR₁ no fluido gengival e na presença da periodontite crônica diminuiu significativamente a expressão de PAR₁, PAR₂ e P3 ($p < 0,05$). Além disso, o tratamento periodontal não cirúrgico em diabéticos resultou no aumento da expressão de PAR₁ e de PAR₂ ($p < 0,05$). Dentro dos limites do presente estudo, sugerimos que os PARs podem estar associados com a inflamação periodontal em diabéticos.

Palavras-chave: Periodontite Crônica. PAR₁. PAR₂. Inflamação Periodontal. Reparação Tecidual. Humanos

ABSTRACT

Abreu IS. Influence of diabetes mellitus type 2 in the expression of protease-activated receptor type 1 (PAR₁) and type 2 (PAR₂) in patients with chronic periodontitis [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão corrigida.

Protease activated receptor type 1 (PAR₁) seems to play a role in periodontal repair, while PAR₂ is associated with periodontal inflammation. These receptors can be activated by gingipain, a protease released from *Porphyromonas gingivalis*, an important periodontal pathogen, and neutrophil proteinase-3 (P3), which is released by neutrophils when exposed to an inflammatory stimulus. Since diabetes is known risk factor to periodontal disease, the aim of this study was to investigate PAR₁ and PAR₂ mRNA expression at the gingival crevicular fluid (GCF) in diabetic patients with chronic periodontitis, before and after non-surgical periodontal treatment. GCF samples and clinical parameters consisting of measuring probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP) and plaque index (PI) were collected from systemically healthy patients and patients with type 2 diabetes *mellitus* with chronic periodontitis, at baseline and after nonsurgical periodontal treatment. PAR₁ and PAR₂, as well the expression of the activators gingipain and P3 at the GCF were quantified by qPCR. The clinical parameters improved significantly after periodontal therapy ($p < 0.01$). Diabetes led to increased expression of PAR₁ in the GCF, and the presence of chronic periodontitis significantly decreased the expression of PAR₁, PAR₂ and P3 ($p < 0.05$). Moreover, non-surgical periodontal treatment in diabetics resulted in increased expression of PAR₁ and PAR₂ ($p < 0.05$). Within the limits of this study, we suggest that PARs may be associated with periodontal inflammation in diabetics.

Keywords: Chronic Periodontitis. PAR₁. PAR₂. Periodontal Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Ativação dos PARs.....	25
Figura 4.1 - Cronograma de execução	38
Figura 5.1 - Expressão gênica de PAR ₁ (mRNA) nos grupos Controle, PC, Diabetes e DPC no baseline e após tratamento periodontal não cirúrgico - *Diferença estatística em relação a não diabéticos com saúde periodontal, •Diferença estatística em relação ao baseline, °Diferença estatística em relação a diabéticos com saúde periodontal (p<0.05)	50
Figura 5.2 - Expressão gênica de PAR ₂ (mRNA) nos grupos Controle, PC, Diabetes e DPC, no baseline e após tratamento periodontal não cirúrgico - *Diferença estatística em relação a não diabéticos com saúde periodontal, •Diferença estatística em relação ao baseline, °Diferença estatística em relação a diabéticos com saúde periodontal, ▪Diferença estatística em relação ao baseline de não diabéticos com periodontite crônica (p<0.05)	51
Figura 5.3 - Expressão gênica de gingipaina (mRNA) nos grupos Controle, PC, Diabetes e DPC, no baseline e após tratamento periodontal não cirúrgico - *Diferença estatística em relação a não diabéticos com saúde periodontal, •Diferença estatística em relação ao baseline, °Diferença estatística em relação a diabéticos com saúde periodontal (p<0.05).....	52
Figura 5.4 - Expressão gênica de P3 (mRNA) nos grupos Controle, PC, Diabetes e DPC, no baseline e após tratamento periodontal não cirúrgico - *Diferença estatística em relação a não diabéticos com saúde periodontal, •Diferença estatística em relação ao baseline, °Diferença estatística em relação a diabéticos com saúde periodontal, ▪Diferença estatística em relação ao baseline de não diabéticos com periodontite crônica (p<0.05)	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Expressão celular de PAR ₁ e de PAR ₂ no periodonto.....	26
Tabela 2.2 - Proteases ativadoras de PAR ₁ e de PAR ₂ no periodonto	28
Tabela 4.1 - Sequência de oligonucleotídeos usados para amplificação do cDNA..	44
Tabela 5.1 - Dados demográficos e parâmetros clínicos periodontais dos grupos Controle, PC, Diabetes e DPC, no baseline e após o tratamento periodontal não cirúrgico	47
Tabela 5.2 - Parâmetros Periodontais dos sítios coletados, no baseline e após o tratamento periodontal não cirúrgico.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Delta C_t$	Cálculo “Cycle Threshold”
μg	Microgramas
μl	Microlitros
μM	Micromolar
μmol	Micromol
AAP	Academia Americana de Periodontia
AGE	Produto final de glicação avançada
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Controle	Grupo Controle
COX-2	Cicloxygenase do Tipo 2
CTGF	Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	Trifosfato de desoxicitidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
Diabetes	Grupo Diabetes
dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina
DMT2	Diabetes mellitus do tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTPs	Trifosfato de desoxinucleotídeos
DP	Desvio padrão
DPC	Grupo Diabetes com periodontite crônica
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
e.m.p	Erro médio percentual
e.p.m	Erro padrão da medida

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FGF-1	Fator de Crescimento de Fibroblastos do Tipo 1
FGF-2	Fator de Crescimento de Fibroblastos do Tipo 2
FG	Fluido Gengival
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FVIIa	Fator FVIIa
FXa	Fator Xa
g	força g
HbA _{1c}	Hemoglobina glicada
HCl	Cloreto de hidrogênio
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular do Tipo 1
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IP	Índice de placa
KCl	Cloreto de Potássio
mg	Miligrama
dL	Decilitro
MgCL ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos do tipo 1
MMP	Metaloproteinase da matriz
MMP-1	Metaloproteinase de matriz do tipo 1
MMP-13	Metaloproteinase de matriz do tipo 13
NCI	Cloreto de Sódio

NF- κ B	Fator nuclear kappa B
nm	Nanômetro
OPG	Osteoprotegerina
P3	Proteinase-3 do neutrófilo
PAR	Receptor ativado por protease
PAR ₁	Receptor ativado por protease do tipo 1
PAR ₁ ^{-/-}	Receptor Ativado por Protease do tipo 1 nulo
PAR ₁ ^{+/+}	Receptor Ativado por Protease do tipo 1 presente
PAR ₂	Receptor ativado por protease do tipo 2
PAR ₂ ^{-/-}	Receptor Ativado por Protease do tipo 2 nulo
PAR ₂ ^{+/+}	Receptor Ativado por Protease do tipo 2 presente
PAR ₃	Receptor ativado por protease do tipo 3
PAR ₄	Receptor ativado por protease do tipo 4
PCA	Proteína C ativada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCS	Profundidade clínica de sondagem
pH	Potencial de hidrogênio
PS	Profundidade de sondagem
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real
RAGE	Receptor de AGE
RANKL	Receptor ativador de fator nuclear kappa B
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
S/N	Se necessário
Seg.	Segundo
SS	Sangramento à sondagem
TCG	Isotiocinato de guanidina
TGF β -1	Fator de transformação do crescimento do tipo β 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral do tipo alfa

tRNA	Ácido ribonucleico total
UDG	Uracil DNA glicosilase
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UV	Ultra Violeta
V	Volts
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
±	mais ou menos
° C	graus Celsius
=	igual
x	vezes
≠	diferente
≈	quase igual
®	marca comercial registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Periodontite crônica.....	20
2.2 O diabetes <i>mellitus</i> do tipo 2 e sua influência no periodonto.....	22
2.3 Receptores ativados por protease (PARs).....	24
2.3.1 Funções biológicas de PAR ₁ no periodonto	28
2.3.2 Funções biológicas de PAR ₂ no periodonto	30
2.4 Influência do diabetes na expressão de PAR ₁ e de PAR ₂	32
3 PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Delineamento do estudo e seleção dos pacientes.....	36
4.2 Avaliação clínica	38
4.3 Tratamento periodontal não cirúrgico.....	39
4.4 Coletas das amostras do fluido gengival.....	40
4.5 Avaliação da expressão gênica de PAR ₁ , PAR ₂ , gingipaina e P3 por Real Time-PCR.....	40
4.6 Análise estatística	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Dados demográficos e parâmetros clínicos periodontais.....	46
5.2 Expressão gênica de PAR ₁ no fluido gengival	49
5.3 Expressão gênica de PAR ₂ no fluido gengival	50
5.4 Expressão gênica de gingipaina no fluido gengival	51
5.5 Expressão gênica de P3 no fluido gengival.....	52
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

A periodontite crônica, uma das enfermidades mais frequentes da cavidade bucal e a causa mais comum de perda dentária (Slots, 2013), tem como fator etiológico determinante um complexo biofilme microbiano, onde espécies bacterianas desempenham um papel específico na patogênese dessa condição, por meio de danos diretos e indiretos aos tecidos do hospedeiro (Feng; Weinberg, 2006). Os fatores de risco para a doença periodontal são as condições locais ou sistêmicas que aumentam a probabilidade de desenvolver ou agravar a doença (Slots, 2013), e desta maneira o diabetes *mellitus* mal controlado é considerado um fator de risco importantíssimo para a doença periodontal (Mealey; Oates, 2006).

O diabetes *mellitus* é um grupo de desordens metabólicas caracterizadas pelo elevado nível de glicose no sangue, sendo que o tipo mais comum é o diabetes *mellitus* do tipo 2 (DMT2) e que ocorre devido à resistência dos tecidos à insulina (Salvi et al., 2008). Esta doença é um dos maiores problemas de saúde crônica do mundo, cuja prevalência está aumentando consideravelmente em todo o mundo (Farzad et al., 2002). Os estudos epidemiológicos apontam o diabetes como um dos principais fatores de risco da periodontite crônica, aumentando sua susceptibilidade em aproximadamente três vezes nesses pacientes (Tsai et al., 2002), além de aumentar a prevalência, a severidade e a progressão da periodontite crônica, especialmente naqueles pacientes com pobre controle glicêmico (Mealey; Oates, 2006; Lakschevitz et al., 2011).

A hiperglicemia, característica dos pacientes diabéticos, está associada à formação mais acentuada de produtos finais de glicação avançada (AGEs), que quando se ligam ao seu receptor (RAGE) são responsáveis por eventos associados à destruição periodontal (Salvi et al., 2008), ao aumento de periodontopatógenos do complexo vermelho (Aeimamanan et al., 2013) e ao aumento de atividade proteolítica (Yu et al., 2012).

Os receptores ativados por protease (PARs) pertencem à família dos receptores acoplados à proteína-G e que apresentam sete domínios transmembrânicos. Seu mecanismo de ativação é único e ocorre por meio de uma

clivagem proteolítica irreversível do domínio N-terminal por uma protease específica, e que resulta na geração de um novo terminal que vai agir como um “ligante amarrado” auto ativando a função do receptor (Vu et al., 1991). Esta clivagem proteolítica é mediada por uma família bem caracterizada de enzimas, as serino proteases, que desempenham papéis importantes em diversas funções biológicas (Macfarlane et al., 2001). Até agora quatro desses receptores foram clonados, PAR₁, PAR₂, PAR₃ e PAR₄.

As principais proteases ativadoras de PAR₁ são a trombina, o fator Xa da coagulação (FXa), a proteína C ativada (PCA), a granzima A, a tripsina e a gingipaina (Ossovsckaya; Bunnett, 2004), e recentemente a metaloproteinase da matriz-1 (MMP-1) e a metaloproteinase da matriz-13 (MMP-13) também foram descritas (Austin et al., 2013). As principais proteases ativadoras de PAR₂ são a tripsina, a triptase do mastócito, o fator VIIa e o fator Xa da coagulação, a serino protease-1 da membrana, a proteinase-3 dos neutrófilos (P3) e a gingipaina (Ossovsckaya; Bunnett, 2004).

Recentes pesquisas têm investigado o papel dos PARs na doença periodontal. Nos tecidos periodontais o PAR₁ pode ser expresso por fibroblastos gengivais humanos, células epiteliais gengivais, células do ligamento periodontal, osteoblastos e monócitos (Lourbakos et al., 2001b; Tanaka et al., 2004; Pagel et al., 2009) e ser ativado pela trombina e gingipaina. O PAR₂ pode ser expresso por neutrófilos, células do epitélio oral, osteoblastos e fibroblastos gengivais humanos (Abraham et al., 2000; Lourbakos et al., 2001a; Noorbakhsh et al., 2003), e ser ativado pela gingipaina, P3 e triptase do mastócito (Abraham et al., 2000; Lourbakos et al., 2001b; Noorbakhsh et al., 2003).

O PAR₁ pode estar associado à reparação tecidual uma vez que sua ativação induz a liberação de fatores de crescimento, tais como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos-1 e -2 (FGF-1 e -2), fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) e fator de transformação do crescimento beta-1 (TGFβ-1) (Pagel et al., 2009). Bueno da Silva et al. (2014) demonstraram que o PAR₁ pode estar associado à reparação tecidual periodontal após tratamento periodontal não cirúrgico em humanos, e Spolidorio et al. (2014)

demonstram que o parstatin, um peptídeo liberado após a ativação de PAR₁, inibe a destruição periodontal após indução de periodontite em ratos.

Os estudos presentes na literatura demonstram que o PAR₂ pode estar envolvido na patogênese da periodontite crônica. A relação PAR₂, gingipaina e periodontite crônica, assim como a perda óssea alveolar e a ativação do PAR₂ pela gingipaina já foram demonstradas *in vivo* (Holzhausen et al., 2005b; 2006). Também foi demonstrado que a ativação de PAR₂ pela P3 levou ao aumento de atividade proteolítica e de mediadores inflamatórios no fluido gengival de indivíduos com periodontite crônica (Holzhausen et al., 2010), e que a maior atividade proteolítica nos sítios periodontais está associada ao PAR₂ e a presença de *P. gingivalis* (Fagundes et al., 2011). Recentemente, Euzébio Alves et al. (2014), demonstraram que a expressão do PAR₂ está relacionada com a inflamação nos tecidos periodontais, e que esta inflamação diminui após o tratamento periodontal.

Em diabéticos, a acentuada formação de AGEs faz com que ocorra o aumento da produção de trombina e consequentemente da ativação de PAR₁ (Ishibashi et al., 2014), sendo que o aumento da ativação plaquetária está associada à formação de trombos nesses pacientes (Gremmel et al., 2013). Ainda, o aumento da vasodilatação em diabéticos, ocorre via PAR₂ e pode estar associado à doença cardiovascular inflamatória (Roviezzo et al., 2005; Matsumoto et al., 2009).

Desta maneira, a hipótese deste estudo foi que o diabetes influencia a expressão de PAR₁ e de PAR₂ no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Periodontite crônica

A periodontite crônica, a principal responsável pela perda de dentes no mundo (Berezow; Darveau, 2011), é definida como a perda patológica de inserção periodontal e osso alveolar (Slots, 2013), e que ocorre devido à presença de um complexo biofilme, onde os periodontopatógenos e seus produtos desencadeiam uma resposta inflamatória (Feng; Weinberg, 2006). O fator microbiano primário que contribui para a periodontite crônica é a mudança na microbiota oral e o fator imunológico primário é a resposta inflamatória destrutiva do hospedeiro (Berezow; Darveau, 2011).

Para que ocorra o início e a progressão da doença periodontal, os microorganismos presentes no biofilme dental precisam estar em concentração suficiente para causar a doença, além de terem a capacidade de sobreviver e propagar-se no biofilme das bolsas periodontais. Desta maneira, os periodontopatógenos induzem mudanças patológicas nos tecidos, direta e indiretamente, e que podem levar à destruição do tecido conjuntivo, reabsorção óssea e possível perda dental (The pathogenesis..., 1999; Travis; Potempa, 2000; Feng; Weinberg, 2006).

Após o estabelecimento do biofilme patogênico, células e moléculas que constituem o sistema imunológico respondem de uma maneira coletiva e coordenada para defender o hospedeiro. A inflamação, que é a principal forma pela qual o sistema imune inato lida com as infecções, é considerada fundamental para o fornecimento de fatores de crescimento e para a sinalização de citocinas, que vão orquestrar os movimentos celulares e teciduais, necessários para a reparação (Eming et al., 2007). A inflamação torna-se crônica quando as respostas do hospedeiro não são suficientes para resolver o desafio microbiano que inicia e perpetua a doença e, nesta situação, o equilíbrio entre a destruição e a cicatrização tecidual, que é delicado, pode inclinar para a destruição (Yucel-Lindberg; Bage, 2013). Inicialmente acontece o recrutamento de neutrófilos, a produção de

anticorpos de proteção e a liberação de citocinas anti-inflamatórias, mas quando o desafio bacteriano torna-se persistente e ocorre o rompimento dos mecanismos homeostáticos, há a liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, prostanóides e proteases (Oringer, 2002).

As proteases, também conhecidas como enzimas proteolíticas, são enzimas capazes de quebrar ligações peptídicas de cadeias proteicas, e por isso participam de importantes processos biológicos. Elas são reconhecidas como importantes moléculas sinalizadoras envolvidas em vários processos vitais, mas quando sua atividade está desregulada podem ocorrer várias patologias, como doenças cardiovasculares e inflamatórias, câncer, osteoporose e desordens neurológicas (Turk, 2006).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes, responsáveis pela primeira linha de defesa do hospedeiro contra infecções, e que têm a função primária de reconhecer, ingerir e destruir os microorganismos (Pham, 2006; Kessenbrock et al., 2011). No citoplasma dessas células existem lisossomos (grânulos azurófilos) que contém serino proteases tais como P3, catepsina G e elastase. Essas proteases, que têm papel crucial na defesa do hospedeiro, são estocadas na sua forma ativa até serem liberadas pelos neutrófilos quando expostos a um estímulo inflamatório (Wiedow; Meyer-Hoffert, 2005; Pham, 2006; Kessenbrock et al., 2011).

Dos periodontopatógenos responsáveis pela periodontite crônica, a *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) é a que apresenta maior patogenicidade (Guo et al, 2010), além de surgir numa fase mais tardia e ser encontradas em sítios onde as lesões são mais avançadas. Este patógeno apresenta vários fatores de virulência, incluindo proteases, fimbria, lipossacarídeos e adesinas, os quais estão envolvidos com o início da destruição periodontal e que estimulam a resposta imune-inflamatória do hospedeiro (The pathogenesis..., 1999). As proteases secretadas pela *P. gingivalis* apresentam alta atividade proteolítica (Dennison; Van Dyke, 1997; The pathogenesis...,1999), sendo que a mais estudada e melhor caracterizada é a gingipaina, responsável pelo seu potencial patogênico e por pelo menos 85% de toda a atividade proteolítica desta bactéria (Guo et al, 2010), além de ser capaz de induzir no hospedeiro uma potente resposta imune humoral (Kinane et al., 1999).

2.2 O diabetes *mellitus* do tipo 2 e sua influência no periodonto

O DMT2 é uma doença metabólica crônica, caracterizada por distúrbios do metabolismo da glicose, e causada pela deficiência de produção de insulina, ação da insulina ou ambas (Lalla; Papapanou, 2011; Preshaw; Bisset, 2013). É um dos maiores problemas de saúde crônica do mundo, que afeta aproximadamente 382 milhões de pessoas, e acredita-se que até 2035 esse número aumente para 592 milhões (IDF, 2013). O tipo mais comum do diabetes é o do tipo 2, que ocorre principalmente em adultos e corresponde a 90-95% dos casos de diabetes (Mealey; Ocampo, 2007; King, 2008).

O aumento da prevalência desta doença representa um sério problema de saúde pública, devido às suas numerosas e muitas vezes graves complicações. Nela ocorre hiperglicemia, que é a concentração elevada de glicose no sangue, e que leva a complicações secundárias tais como retinopatias, nefropatias, doenças cardiovasculares, neurites e dificuldade de cicatrização (Tsai et al., 2002; Mealey; Oates, 2006). A doença periodontal pode ser considerada a sexta complicação mais importante do diabetes (Löe, 1993).

O efeito do diabetes no periodonto tem sido bastante estudado nas últimas décadas, e muitos desses estudos foram conduzidos em uma população de índios Pima, da Comunidade de índios do Gila River no Arizona, os quais apresentam o maior índice de DMT2 no mundo (Preshaw; Bisset, 2013). Nesses estudos, foi demonstrado que o diabetes aumenta o risco do paciente desenvolver periodontite crônica em aproximadamente três vezes, além de ser mais prevalente e severa (Nelson et al., 1990; Tsai et al., 2002).

A hiperglicemia, característica do diabetes, age de uma maneira nociva através de várias vias e altera a expressão gênica e/ou função proteica, que contribuem para a disfunção e dano celular, associado com disfunções micro e macrovasculares (King, 2008). Ela desencadeia respostas inflamatórias exacerbadas e desreguladas, considerada a ligação entre o diabetes e a periodontite crônica (Preshaw; Bisset, 2013).

Os AGEs, formados como resultado da glicosilação não enzimática irreversível das proteínas estruturais do corpo, são encontrados no plasma, na parede dos vasos e nos tecidos (Salvi et al., 1997). Com o envelhecimento e sob condições fisiológicas sua formação é vagarosa, mas na presença da hiperglicemia crônica sua produção aumenta intensamente (Barbosa et al., 2008). Quando os AGEs se acumulam nos tecidos, ocorre o aumento da espessura da membrana basal e rigidez nos vasos (Listgarten et al., 1974; Salvi et al., 1997), que levam à dificuldade na difusão de oxigênio, na eliminação de metabólitos, na migração de leucócitos e na difusão de fatores imune, que vão contribuir para a patogênese da periodontite (Salvi et al., 1997; Lalla et al., 2000; Mealey; Oates, 2006).

Os receptores de AGEs (RAGEs) são minimamente expressos nos tecidos e vasculatura sob condições fisiológicas, no entanto, em diabéticos sua expressão está aumentada em células como macrófagos, monócitos, da musculatura lisa, endoteliais e neurônios. Quando esses receptores ligam-se aos AGEs, alteram as respostas inflamatórias e aumentam a secreção de citocinas inflamatórias (Lalla et al., 2000; Barbosa et al., 2008; Lalla; Papapanou, 2011; Preshaw; Bisset, 2013). A interação AGE-RAGE de monócitos aumenta o estresse oxidativo celular, estimula a produção de metaloproteinases da matriz (MMPs), moléculas de adesão, além de ativar a transcrição do fator nuclear Kappa B (NF- κ B), que altera o fenótipo de monócitos e macrófagos e leva ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1- β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) (Mealey; Oates, 2006). A interação RAGE-AGE de células endoteliais aumenta a permeabilidade vascular e a formação de trombos, além de ativar a transcrição do NF- κ B (Lalla et al., 2000; Mealey; Oates, 2006; Barbosa et al., 2008).

As funções de células imunes, incluindo neutrófilos, monócitos e macrófagos estão alteradas em diabéticos (Mealey; Oates, 2006). Os neutrófilos, geralmente hipofuncionais, apresentam sua capacidade de aderência, fagocitose e quimiotaxia deficiente, o que torna o hospedeiro mais suscetível a infecções (Manouchehr-Pour et al. 1981; Mealey; Oates, 2006, Mealey; Ocampo, 2007). Ainda, monócitos/macrófagos apresentam-se hiperresponsivos, e como consequência há o aumento da produção local de citocinas e mediadores pró-inflamatórias, que levam a

destruição tecidual, a reabsorção óssea e dificuldade de cicatrização (Mealey; Oates, 2006; Mealey; Ocampo, 2007).

A cicatrização de feridas é uma sequência complexa e coordenada de eventos, que envolve migração de células específicas para o local da ferida, inflamação, proliferação celular, angiogênese, formação dos componentes da matriz, remodelamento e finalmente fechamento da ferida (Barbosa et al., 2008). Nos diabéticos, a hiperglicemia prejudica a cicatrização e a remodelação óssea, como demonstrada em vários estudos (Mealey; Oates, 2006). O estado hiperglicêmico crônico leva à diminuição da proliferação e crescimento celular dos fibroblastos do ligamento periodontal, à diminuição da síntese de colágeno, interação AGE-RAGE de fibroblastos que pode levar à redução da deposição de colágeno, e ao aumento da atividade da collagenase no fluido gengival. Ocorre também aumento da apoptose de fibroblastos e osteoblastos nesses indivíduos (Mealey; Oates, 2006). O diabetes altera a homeostase do osso alveolar, devido ao aumento da expressão do receptor RANKL nos tecidos periodontais que leva ao desequilíbrio da balança RANKL/osteoprotegerina (OPG), o que explicaria, em parte, o aumento da destruição óssea alveolar nos diabéticos (Lalla; Papapanou, 2011; Preshaw; Bisset, 2013).

Com relação à microbiota, as evidências sugerem que a microbiota subgengival de diabéticos e não diabéticos é similar. No entanto, diabéticos podem apresentar níveis de glicose no fluido gengival duas vezes mais elevados quando comparados com não diabéticos (Mealey; Oates, 2006), e desta maneira favorecer o crescimento de algumas espécies (Preshaw; Bisset, 2013). De fato, Aeimamaman et al. (2013) demonstraram que a *P. gingivalis* está em maior número em indivíduos diabéticos com pobre controle glicêmico quando comparada com indivíduos não diabéticos.

2.3 Receptores ativados por protease (PARs)

Durante a procura pelo receptor responsável pela ativação das plaquetas pela trombina, foi identificado o PAR₁. Foi então estabelecido o mecanismo de

ativação deste receptor, que inicialmente recebeu o nome de receptor para trombina (Vu et al., 1991; Coughlin; Camerer, 2003). Posteriormente, Nystedt et al. (1994) clonaram um receptor semelhante em estrutura ao PAR₁, e que era ativado pela tripsina, mas não pela trombina. Este receptor recebeu o nome de PAR₂.

Até agora quatro PARs foram clonados: PAR₁, PAR₂, PAR₃ e PAR₄ (O'Brien et al., 2001). Eles apresentam o mesmo mecanismo de ativação, podem ser ativados por diferentes proteases e apresentam propriedades biológicas distintas, desde a homeostase até transmissão da dor (Ossovskaya; Bunnett, 2004).

Os PARs pertencem a uma família de receptores acoplados à proteína-G e que apresentam sete domínios (alças) transmembrânicos. Seu mecanismo de ativação é único e ocorre por meio da clivagem proteolítica irreversível do domínio N-terminal por uma protease, que resulta na geração de um novo N-terminal que vai agir como um “ligante amarrado” auto ativando a função do receptor e iniciando a transdução do sinal (Déry et al., 1998; O'Brien et al., 2001; Macfarlane et al., 2001; Ossovskaya; Bunnett, 2004) (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Ativação dos PARs - A protease reconhece o domínio amino (N)-terminal do PAR, cliva o receptor, desmascara um novo N terminal que funciona como ligante amarrado e que vai acoplar no corpo do receptor, auto ativando o receptor e iniciando a transdução de sinais.

A clivagem proteolítica é mediada por uma família de enzimas bem caracterizadas, as serino proteases, que requerem serina no seu sítio de ativação.

Elas podem ser da cascata de coagulação, das células inflamatórias e do trato digestivo, e classicamente desempenham papel importante em diversas funções biológicas, particularmente em relação à formação de coágulo e cicatrização de feridas (Macfarlane et al., 2001; Ossovskaya; Bunnett, 2004).

Como os PARs são encontrados em todos os tecidos e tipos celulares, as diferentes vias de sinalização intracelular identificadas dependem do tipo celular estudado. As proteases clivam e ativam os receptores, que por sua vez controlam uma variedade de funções biológicas tais como digestão de proteínas da dieta, coagulação do sangue, homeostase, transmissão de dor, regulação do ciclo celular, reparação tecidual, secreção e inflamação (Macfarlane et al., 2001; Ossovskaya e Bunnett, 2004; Tanaka et al., 2004).

O PAR₁ é encontrado em plaquetas, epitélio, endotélio, fibroblastos, neutrófilos e células T, além de células da musculatura lisa, neurônios e astrócitos (Déry et al., 1998; Coughlin, 2000; O'Brien et al., 2001; Noorbakhsh et al., 2003). Nos tecidos periodontais são expressos por fibroblastos gengivais humanos, células epiteliais gengivais, células do ligamento periodontal, osteoblastos e monócitos (Lourbakos et al., 2001b; Tanaka et al., 2004; Pagel et al., 2009).

O PAR₂ é encontrado em diferentes células do corpo humano, especialmente em células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e neutrófilos. Nos tecidos periodontais em neutrófilos, células do epitélio oral, osteoblastos e fibroblastos gengivais humanos (Abraham et al., 2000; Lourbakos et al., 2001a; Noorbakhsh et al., 2003). A tabela 2.1 apresenta as principais células que expressam o PAR₁ e o PAR₂ no periodonto.

Tabela 2.1 - Expressão celular de PAR₁ e de PAR₂ no periodonto

PAR ₁	PAR ₂
Células epiteliais gengivais	Células do epitélio oral
Células do ligamento periodontal	Células endoteliais
Fibroblastos gengivais humanos	Fibroblastos gengivais humanos
Monócitos	Neutrófilos
Osteoblastos	Osteoblastos
Neutrófilos	

Apesar do PAR₁ ter sido identificado como o receptor de trombina e o PAR₂ de tripsina, já foi demonstrado que esses receptores podem ser ativados por outras proteases. Além da trombina, o PAR₁ pode ser ativado pela gingipaina, PCA, Fator Xa da coagulação, granzima A e tripsina (Ossovskaia; Bunnett, 2004), e recentemente a MMP-1 e a MMP-13 foram sugeridas (Jaffré et al., 2012). A MMP-1, considerada uma enzima importante para a remodelação óssea porque degrada o colágeno, cliva o PAR₁ de plaquetas em um sítio diferente da trombina e induz trombose arterial (Jaffré et al., 2012; Austin et al., 2013). Ela também pode clivar PAR₁ de células tumorais e de células endoteliais, sendo responsável pela gênese de tumor e angiogênese, respectivamente. A MMP-13, uma protease pouco expressa em corações saudáveis, tem sua expressão aumentada em condições patológicas, cliva PAR₁ de fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos, num sítio diferente da MMP-1 e da trombina, e talvez esteja envolvida na disfunção cardíaca (Jaffré et al., 2012).

O PAR₂ pode ser ativado pela tripsina, triptase de mastócitos, fatores de coagulação (Vlla / Xa), serino-protease-1 da membrana, gingipaina e P3 (Ossovskaia; Bunnett, 2004).

Duas proteases responsáveis pelo colapso periodontal e que são encontradas no fluído gengival também podem ativar os PARs: a gingipaina e a P3. A gingipaina é produzida e liberada pela *P. gingivalis*, e pode interagir diretamente com os receptores de superfície das células do hospedeiro e modular a resposta inata (Travis; Potempa, 2000). Já foi demonstrado que a gingipaina pode ativar PAR₁ e PAR₂ em vários tipos celulares *in vitro* (Lourbakos et al., 1998; Lourbakos et al., 2001a; Lourbakos et al., 2001b; Uehara et al., 2005; Giacaman et al., 2009). A P3, liberada nos sítios de inflamação, é uma importante enzima ativadora do PAR₂ sob essa condição (Lourbakos et al., 2001b; Uehara et al., 2003). Na tabela 2.2 encontra-se um resumo das principais proteases ativadoras de PAR₁ e de PAR₂.

Tabela 2.2 – Principais proteases ativadoras de PAR₁ e de PAR₂.

PAR ₁	PAR ₂
Trombina	Tripsina
FXa	Triptase
Proteína C ativada	FXa
Granzima A	FVIIa
Gingipaina	Serino protease-1 da membrana
Tripsina	Proteinase-3
MMP-1 e MMP-13	Gingipaina

Os PARs são na sua essência formados por peptídeos que levam seu próprio ligante, e que se mantêm em silêncio até serem desmascarados pela clivagem do receptor no sítio específico. É importante mencionar que na ausência da proteólise pela serino protease, PAR₁, PAR₂ e PAR₄, mas não PAR₃, podem ser ativados seletivamente por peptídeos sintéticos correspondentes às sequências do “ligante amarrado”, independentemente da clivagem do receptor. Para cada PAR um peptídeo agonista foi desenvolvido. Esses peptídeos (PAR-AP) são de grande valor porque permitem a avaliação do potencial fisiológico desses receptores e representam ferramentas farmacológicas importantes, porque não apresentam as complicações decorrentes da ativação por proteases agonistas (Noorbakhsh et al., 2003; Vergnolle, 2005).

2.3.1 Funções biológicas de PAR₁ no periodonto

A trombina, que é o ativador mais potente de PAR₁, é produzida quando o plasma entra em contato com fatores teciduais devido à ruptura da integridade vascular (Coughlin, 2000). Esta enzima, além de contribuir diretamente para a

coagulação convertendo fibrinogênio em fibrina na etapa final da coagulação, também orchestra respostas celulares tais como agregação plaquetária, proliferação da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular, que contribuem para o desenvolvimento de doenças vasculares (Cocks; Moffatt, 2000; Hirano; Kanaide, 2003), e que são consistentes com seu papel primário de cicatrização vascular e revascularização (Macfarlane et al., 2001). Essas respostas celulares acontecem, em parte, através da ativação do PAR₁ (Coughlin, 2000). Cheung et al. (1999) demonstraram que ratos PAR₁ knockout (PAR₁^{-/-}) apresentam resposta alterada à injúria vascular, sugerindo que esse receptor tem um papel na regulação da matriz extracelular na vasculatura. Assim, a ativação de PAR₁ pode estar associada à reparação tecidual, porém, o seu papel nos tecidos periodontais ainda não está bem estabelecido.

Alguns estudos *in vitro* foram realizados, e Loubakos et al. (2001a) demonstraram que a gingipaina é um potente ativador de PAR₁ de plaquetas, e que através dessa ativação ocorre agregação plaquetária. Arayatrakoolikit et al. (2008) demonstraram que quando a trombina cliva PAR₁ de células do ligamento periodontal, pode induzir a secreção da OPG, uma proteína fundamental na prevenção da reabsorção óssea. Pagel et al. (2009) sugeriram que quando a trombina cliva PAR₁ de osteoblastos, regula a atividade da cicloxigenase (COX2) imediatamente após injúria, e induz a expressão de fatores associados à angiogênese e reparação tecidual, como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), IL-6, fator de crescimento de fibroblastos-1 e -2 (FGF-1 e FGF-2), fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), fator de transformação do crescimento beta-1 (TGFβ-1) nos estágios iniciais de cicatrização óssea. Ainda, Ohuchi et al. (2010) demonstraram que a ativação do PAR₁ pela trombina estimula a proliferação de fibroblastos gengivais de ratos.

Por outro lado, Loubakos et al. (2001b) observaram que quando células epiteliais são clivadas pela gingipaina liberam IL-6 via PAR₁. Tanaka et al. (2004) demonstraram que fibroblastos gengivais humanos liberam IL-6 quando o PAR-1 é clivado pela trombina, e Giacaman et al. (2009) demonstraram que a ativação de queratinócitos orais pela gingipaina aumenta a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1α, IL-1β, IL-6 e TNF-α, via PAR₁.

Num estudo *in vivo*, Wong et al. (2010) submeteram ratos PAR₁^{-/-} e PAR₁^{+/+} à infecção oral pela *P. gingivalis* e demonstraram que esse receptor pode não estar associado ao desenvolvimento da periodontite crônica.

Após a ativação de PAR₁, ocorre a liberação de um peptídeo chamado parstatin. Acredita-se que o parstatin apresente um potente efeito antiangiogênico, que iniba o VEGF e tenha um efeito anti-inflamatório através da diminuição do fluxo de leucócitos, porém, pouco se sabe sobre o efeito do parstatin durante a ativação do PAR₁. Spolidorio et al. (2014) conduziram um estudo *in vivo*, e demonstraram que o parstatin inibe a destruição periodontal após indução de periodontite crônica em ratos, e que este peptídeo não dificultou a reparação tecidual, apesar de seu efeito antiangiogênico. Os pesquisadores acreditam que o parstatin possa apresentar um mecanismo que modula a resposta do hospedeiro durante a periodontite crônica.

Recentemente, Bueno da Silva et al. (2014) demonstraram que a expressão gênica de PAR₁ em leucócitos e células epiteliais presentes no fluido gengival de indivíduos com periodontite crônica estava diminuída durante a inflamação e após o tratamento periodontal não cirúrgico, essa expressão aumentou. Os autores também demonstraram que os níveis de biomarcadores da inflamação periodontal diminuíram após o tratamento periodontal e foram inversamente correlacionados ao aumento da expressão de PAR₁ em células do fluido gengival. Desta forma, os pesquisadores sugerem que este receptor pode estar associado à reparação tecidual periodontal após tratamento periodontal não cirúrgico em humanos.

2.3.2 Funções biológicas de PAR₂ no periodonto

O PAR₂ é expresso por muitas células envolvidas na inflamação, como endoteliais, mastócitos, neutrófilos e epiteliais, e após ativação liberam mediadores inflamatórios. Esse receptor tem um papel importante nos processos inflamatórios patológicos (Vergnolle, 2005) e o envolvimento do PAR₂ na reação inflamatória tem sido sugerido por diversos estudos (Holzhausen et al., 2005b).

Num estudo *in vitro*, Loubakos et al. (1998) demonstraram que a gingipaina pode clivar e ativar PAR₂ em neutrófilos. Foi demonstrado também que a gingipaina induz a secreção de IL-6, um potente estimulador de reabsorção óssea, por células epiteliais humanas via PAR₂ (Loubakos et al., 2001b).

Uehara et al. (2002) demonstraram que quando células epiteliais orais são ativadas pela P3, podem induzir a produção de IL-8 e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) via PAR₂, além de expressar moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1). Em 2003, Uehara et al. demonstraram que a P3 pode induzir fibroblastos gengivais humanos a produzir IL-8 e MCP-1, também via PAR₂. Em 2005, este mesmo grupo demonstrou que a gingipaina pode ativar fibroblastos gengivais humanos e induzir a secreção do fator de crescimento de hepatócitos (HGF), e desta maneira mediar inflamação via PAR₂ (Uehara et al., 2005). Em 2008, os autores demonstraram que a gingipaina aumenta a secreção de citocinas pró-inflamatórias de células monocíticas humanas através dos receptores do tipo PAR₁, PAR₂ e PAR₃, sugerindo uma relação entre a *P.gingivalis* e o sistema de defesa. Todas essas pesquisas sugerem o envolvimento de PAR₂ com processos inflamatórios, como a periodontite crônica (Uehara et al., 2008).

Ainda, osteoblastos expressam PAR₂, e uma vez clivados pela gingipaina podem ativar osteoclastos e estimular reabsorção óssea (Abraham et al., 2000). Belibasakis et al. (2010) demonstraram que a *P.gingivalis* pode induzir o aumento da expressão gênica do PAR₂ em fibroblastos gengivais e células T de humanos.

Estudos *in vivo* demonstraram que a ativação do PAR₂ pode levar ao relaxamento de vasos sanguíneos, hipotensão, aumento da permeabilidade vascular, adesão e marginação leucocitária, infiltração granulocítica e dor, que são sinais cardinais da inflamação (Cocks; Moffatt, 2000; Vergnolle et al., 2001; Coughlin; Camerer, 2003).

Holzhausen et al. (2005a) demonstraram que a administração do agonista sintético de PAR₂ (SLIGRL) causa periodontite crônica em ratos por meio de um mecanismo envolvendo liberação de prostaglandinas e ativação de MMPs. Quando camundongos foram submetidos à infecção periodontal pela *P. gingivalis*, foi demonstrado que os animais PAR₂ knockout (PAR₂^{-/-}) apresentaram menor perda

óssea, enquanto os que apresentavam PAR₂ (PAR₂^{+/+}) apresentaram aumento de células inflamatórias, prostaglandina E₂, IL-6 e IL-1 β (Holzhausen et al., 2006).

Para determinar o papel de PAR₂ na perda óssea alveolar, Wong et al. (2010) submeteram ratos PAR₂^{-/-} e PAR₂^{+/+} à infecção oral pela *P. gingivalis*. Eles sugeriram que o PAR₂ tem um papel importante na periodontite, através da liberação da IL-6 por células epiteliais orais quando ativadas pela gingipaina, e por neutrófilos quando ativados pela P3. Ratos PAR₂^{-/-} apresentaram menor exposição radicular e menor perda óssea alveolar.

Holzhausen et al. (2010) demonstraram que há um aumento significativo (2 a 3 vezes) da expressão de PAR₂ no periodonto de pacientes com periodontite crônica em relação a pacientes periodontalmente saudáveis, e que esse aumento está associado com a presença de níveis significativamente elevados dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-1 α , IL-6 e IL-8 no fluido gengival. Este estudo também demonstrou uma maior prevalência da *P. gingivalis* e P3 durante a periodontite, as quais se correlacionaram positivamente com a expressão de PAR₂. Fagundes et al. (2011) demonstraram que sítios com maior presença de *P. gingivalis* estão associados com maior expressão de PAR₂ na periodontite crônica em humanos.

Recentemente, foi demonstrado que o tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes com periodontite crônica levou a diminuição dos níveis de proteases, e que os mediadores pró-inflamatórios estão associados com o aumento da expressão do PAR₂, sugerindo que a infecção periodontal influencia a expressão do PAR₂ (Euzebio Alves et al., 2014).

2.4 Influência do diabetes na expressão de PAR₁ e de PAR₂

Segundo Samad; Ruf (2013) a atividade plaquetária, que é responsável pela trombose e inflamação, é elevada em pacientes obesos e pacientes com DMT2. Undas et al. (2008) avaliaram pacientes com índice elevado de glicose e síndrome coronária e demonstraram que a hiperglicemia aumenta a produção de trombina e a

atividade plaquetária em resposta à injúria vascular durante infarto agudo do miocárdio. Gremmel et al. (2013) investigaram o impacto do diabetes na ativação plaquetária, mediada por PAR₁, em pacientes diabéticos com aterosclerose e concluíram que o diabetes aumenta a ativação plaquetária nesses pacientes.

Nos diabéticos ocorre formação mais acelerada de AGEs, e a associação de AGEs com o PAR₁ foi demonstrada em um estudo *in vitro*, conduzido por Ishibashi et al. (2014). Os pesquisadores demonstraram que a expressão desse receptor em células endoteliais de veias umbilicais de humanos aumenta, após tratamento com AGEs, sugerindo que os AGEs podem aumentar a sinalização dessas células pela trombina, via PAR₁. Neste mesmo estudo, quando utilizado o rivaroxaban, um inibidor do fator Xa, que transforma pró-trombina em trombina, os efeitos nocivos dos AGEs foram bloqueados porque reduziu a formação de trombina e consequentemente a ativação do PAR₁ por esta protease.

Um exemplo de disfunção endotelial associada à inflamação cardiovascular está presente em diabéticos. Roviezzo et al. (2005) investigaram o papel de PAR₂ na patogênese da disfunção arterial de ratos diabéticos, e demonstraram que esse receptor tem um potente efeito vasodilatador. Matsumoto et al. (2009) investigaram artérias mesentéricas isoladas de ratos Goto-Kakizaki, que oferecem um modelo conveniente de estudo de diabetes sem oferecer os fatores de confusão como obesidade e hipertensão. Os pesquisadores demonstraram que a vasodilatação, que está aumentada nesses ratos, ocorre devido ao aumento da expressão do PAR₂.

A associação entre o diabetes, os níveis baixos de insulina, o estado inflamatório presente nesses pacientes e o importante papel das proteases para iniciar o processo inflamatório via PAR₂, levaram Hyun et al. (2010) a investigar a interação entre a insulina e os agonistas de PAR₂ em modelos de edema em patas de ratos. Eles concluíram que a administração de insulina no sítio de inflamação, atenua os efeitos inflamatórios mediados por esse receptor.

O DMT2 e a inflamação são mediados por algumas enzimas proteolíticas que compartilham um mesmo alvo: o PAR₂. Num estudo com ratos obesos, Lim et al. (2013) demonstraram que o PAR₂ está aumentado nesses ratos, sugerindo que esse receptor pode ser considerado um biomarcador de obesidade, positivamente

relacionado com índice de massa corporal. Os autores sugerem que a relação entre o metabolismo e inflamação ocorre devido ao PAR₂.

Com base em estudos prévios, podemos concluir que o diabetes *mellitus* altera a expressão gênica dos receptores PAR₁ e PAR₂ no fluído gengival de pacientes diabéticos com periodontite crônica.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a expressão gênica dos receptores ativados por protease, PAR₁ e PAR₂, no fluido gengival de pacientes com DMT2 e periodontite crônica, antes e após o tratamento periodontal não cirúrgico.

Objetivo específico 1

Avaliar a influência do DMT2 sobre a expressão de PAR₁ e PAR₂ no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica.

Objetivo específico 2

Avaliar a efeito do tratamento periodontal não cirúrgico sobre a expressão de PAR₁ e PAR₂ no fluido gengival de pacientes com DMT2 e periodontite crônica.

Objetivo específico 3

Avaliar a expressão gênica dos ativadores gingipaina e P3 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica, diabéticos ou não, antes e após o tratamento periodontal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo e seleção dos pacientes

No Centro de Diabetes da UNIFESP foram triados 720 pacientes diabéticos que estavam em acompanhamento médico, sob a supervisão do endocrinologista responsável Professor Doutor Sérgio Dib. Após anamnese foram excluídos 589 pacientes que não se enquadraram nos critérios de elegibilidade, e apenas 60 foram selecionados para o estudo. Nesses pacientes o tempo do diabetes variou entre 05 a 36 anos e muitos relataram a dificuldade em realizar o controle glicêmico.

Depois de selecionados, eles foram encaminhados para a Clínica Odontológica da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), onde os pacientes não diabéticos, num total de 343, também foram triados. Foram incluídos neste estudo pacientes de ambos os sexos, com idade entre 35 e 75 anos, com pelo menos 15 dentes naturais (excluindo terceiros molares) e não fumantes. Os indivíduos diabéticos deveriam ter sido diagnosticados por um médico endocrinologista pelo menos cinco anos antes do início do estudo e apresentar percentuais sanguíneos de hemoglobina glicada entre 6,5% e 8,5% no início do estudo. O diagnóstico de periodontite crônica moderada generalizada foi o de pelo menos 30% dos sítios com profundidade clínica de sondagem (PCS) ≥ 5 mm e no máximo 60% dos sítios com PCS ≤ 7 mm, nível clínico de inserção (NCI) ≥ 4 mm, placa visível e sangramento à sondagem (SS).

Os critérios de exclusão incluíram alguma condição sistêmica (exceto diabetes) que pudesse afetar a progressão da doença periodontal (Ex: desordens imunológicas); o uso de medicamentos como anticoagulantes, antibióticos, antineoplásicos, contraceptivos ou antidepressivos nos seis meses anteriores ao início do estudo; uso de anti-inflamatório três meses antes do início do estudo; história de reações anafiláticas; uso de aparelhos ortodônticos; tratamento periodontal seis meses antes do início deste estudo; ser gestante e/ou lactante ou

apresentar complicações decorrentes do diabetes, tais como retinopatias, hipertensão, nefropatias ou neuropatias.

A coleta de sangue periférico dos diabéticos foi realizada pelo Laboratório Delboni Auriemo, no mesmo dia e horário da coleta inicial do fluido gengival e também um mês após o término do tratamento periodontal. Esses pacientes deveriam estar em jejum por pelo menos duas horas antes da coleta do sangue. Nos pacientes sistemicamente saudáveis foi adotado o teste de glicemia rápida para comprovar que a glicemia destes pacientes não ultrapassava 100 mg/dl (ADA, 2011). Os pacientes diabéticos reportaram o uso e o tempo de uso de medicamentos para o controle do diabetes (agentes hipoglicemiantes, insulina ou a combinação de agentes hipoglicemiantes com insulina).

De acordo com os critérios de inclusão e exclusão, foram formados quatro grupos de estudo. O grupo Controle composto por 30 pacientes sistemicamente saudáveis sem periodontite crônica, o grupo Diabetes composto por 30 pacientes com DMT2 sem periodontite crônica, o grupo DPC composto por 30 pacientes com DMT2 e periodontite crônica e o grupo PC composto 30 pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite crônica. Formados os grupos, foram totalizados 120 pacientes (n=120).

Os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A), previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Parecer 544.563, Anexo B) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP/UNIFESP: 0643/11, Anexo C).

Todos os indivíduos da pesquisa foram avaliados por meio de uma ficha clínica/anamnese, examinados, tratados e tiveram suas amostras coletadas na Clínica da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. As amostras coletadas foram processadas no Laboratório de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade São Paulo.

Na figura 4.1 está demonstrado o cronograma de execução do estudo.

Figura 4.1. Cronograma de execução

4.2 Avaliação clínica

O exame clínico periodontal foi realizado por um único examinador previamente treinado e calibrado (APSB), com o objetivo de diagnosticar a periodontite crônica moderada generalizada e também reavaliar esses pacientes ao término do tratamento. A metodologia utilizada para a calibração do examinador foi a descrita por Araújo et al. (2003), onde foram considerados: o erro padrão da medida (e.p.m.) e o erro médio percentual (e.m.p.) para os parâmetros clínicos periodontais contínuos (PCS e NCI), obedecendo a um valor de Kappa de 0,81.

No baseline, o exame periodontal foi realizado para análise dos seguintes parâmetros periodontais:

- Profundidade de Sondagem (PS): distância em mm entre a margem gengival e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.
- Nível Clínico de Inserção (NCI): distância, em milímetros, entre a junção esmalte-cimento e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

- Sangramento à Sondagem (SS) (Lenox; Kopczyk, 1973): (+) presença ou (-) ausência.
- Índice de placa (IP) (O’Leary et al., 1972): indica a presença de placa bacteriana nas faces: mesial, distal, vestibular e lingual.

Para esse exame foram utilizadas sondas periodontais milimetradas tipo PCPUNC-BR 15 (Hu Friedy, RJ-Brasil) em todos os dentes, exceto os terceiros molares, e em seis sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual).

4.3 Tratamento Periodontal Não-Cirúrgico

Os indivíduos deste estudo foram submetidos à terapia periodontal na clínica de graduação da FOUSP de acordo com as necessidades apresentadas. Todos os quatro grupos receberam orientação de higiene oral para controle de placa bacteriana, com escova e fio dental, e os pacientes dos grupos Controle e Diabetes também receberam profilaxia oral.

Os pacientes dos grupos portadores de periodontite crônica (PC e DPC) receberam tratamento periodontal não cirúrgico por periodontistas (APSB e DYT), que incluiu remoção de cálculo supragengival com o uso de ultrassom; eliminação de fatores iatrogênicos S/N (restaurações, próteses); raspagem, alisamento e polimento corono-radicular com instrumentação manual e uso de ultrassom por sextante e integração clínica S/N (restaurações provisórias de cárie, extrações de dentes condenados). Este tratamento consistiu de quatro a seis consultas, as quais foram semanais e dependeram das características clínicas de cada paciente.

Finalizada a fase dos procedimentos básicos, iniciou-se a fase do pós-tratamento por um período de quatro semanas. Neste período os pacientes receberam controle de placa bacteriana profissional semanal (orientação de higiene bucal, raspagem e profilaxia supragengival) até o momento da reavaliação, em que

novamente foram examinados para os mesmos parâmetros clínicos iniciais (PCS, NCI, SS e IP). Neste momento foi verificado o controle de placa e a presença/ausência de inflamação dos tecidos periodontais. Os pacientes que apresentassem sinais clínicos de inflamação seriam descartados do estudo, e nenhum paciente foi excluído.

4.4 Coleta de amostra de fluido gengival

As coletas do fluido gengival foram realizadas em sítios previamente escolhidos antes do tratamento periodontal não cirúrgico e também nos mesmos sítios, após a reavaliação periodontal. Nos grupos dos pacientes com periodontite crônica (PC e DPC), o fluido gengival de cada indivíduo foi coletado em cinco sítios doentes da maxila (PCS entre 4mm e 6 mm). Para os grupos controle (Controle e Diabetes) foram coletadas amostras de cinco sítios (PCS $\leq$ 3 mm). Os sítios selecionados foram isolados com roletes de algodão e um sugador de saliva foi utilizado para diminuir o risco de contaminação salivar. Os dentes foram suavemente secos com jatos de ar por cinco segundos e três tiras de papel (PerioPaper, ProFlow Inc., Amityville, NY, USA) foram introduzidas individualmente no sulco/bolsa gengival por 30 segundos cada tira. As amostras foram armazenadas em tubos plásticos (eppendorf) a -80°C . Para a análise foi feito um “pool” das amostras para os sítios doentes e outro para os sítios saudáveis de cada paciente. As amostras que estavam visualmente contaminadas com sangue foram descartadas.

4.5 Avaliação da Expressão Gênica de PAR₁, PAR₂, gingipaina e P3 por Real Time-PCR

A expressão gênica dos receptores PAR₁ e PAR₂ e de seus ativadores gingipaina e P3, presentes em amostras do fluido gengival coletadas antes e após o

tratamento periodontal não cirúrgico, foram avaliadas pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR).

O RNA total (tRNA) foi obtido pela homogeneização das amostras do fluido gengival em Trizol [isotiocinato de guanidina (TCG) em solução de fenol – Invitrogen Brasil Ltda. (1mL/100µL de amostra)]. Depois de homogeneizadas, as amostras foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente e então centrifugadas a 12.000g (15min/4⁰C – Eppendorf Centrifuge 5417R – Eppendorf, Califórnia, EUA). Posteriormente 0,8 mL da fase superior foram transferidos para um novo tubo eppendorf e 0,2 mL de clorofórmio adicionados. Após 15 seg. de agitação rigorosa por inversão, os tubos foram deixados em repouso por 2-3 min à temperatura ambiente e posteriormente centrifugados a 12.000 g (15min/4⁰C). A fase aquosa sobrenadante (≈0,6 mL) foi separada para um novo tubo.

O tRNA foi precipitado pela adição de um volume de isopropanol 100% para cada volume de sobrenadante. Após 15 seg. de agitação vigorosa por inversão os tubos foram incubados por 10 min à temperatura ambiente e posteriormente centrifugados a 12.000 g (10 min/4⁰C)

Para a lavagem do tRNA, os sobrenadantes foram descartados (vertidos) e o RNA precipitado (pellet) lavado com etanol 100% (1mL/mL de Trizol) e posteriormente centrifugados a 7.600 g (5min/4⁰C). Após a centrifugação os sobrenadantes foram descartados (vertidos) e o pellet lavado com 1mL de etanol 75% (diluído em água tratada com dietil-piropicarbato (DEPC) 0,01% e inativado em autoclave). Uma nova centrifugação a 7.600 g (5min/4⁰C) foi realizada, sendo que o sobrenadante novamente desprezado. Os tubos foram então deixados por 10 min à temperatura ambiente para total secagem dos pellets, dando início à digestão das amostras com DNase.

Para a digestão do DNA, os pellets secos foram resuspendidos 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 1µL de DNase (Invitrogen Brasil Ltda.)] sendo o volume final de 50 µL. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37⁰C por 15 min. Posteriormente foi adicionado 1 µL de solução de parada (EDTA 25 nM) e em seguida feita a re-extração do tRNA.

Para a re-extração do tRNA foram adicionados 50 µL de água DEPC inativa 0,01% nas amostras previamente submetidas ao ensaio de digestão do DNA. Após, foram adicionados 200 µL da mistura fenol saturado em tampão (Invitrogen Brasil Ltda.) / clorofórmio 1:1 e feita agitação por inversão para então serem incubados por 2-3 min à temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g (15 min/4°C). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a este tubo adicionado 200 µL de isopropanol 100% (para nova precipitação do RNA). Após agitação por 15 seg. e incubação por 10 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g (10 min/ 4°C), sendo o sobrenadante descartado (vertido). Foram adicionados 500 µL de etanol 75% para lavagem do pellet e feita uma nova centrifugação a 7.600 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 ressuspendido em volume adequado ($\approx$ 20-30 µL) de água DEPC inativa 0,01%. As absorbâncias medidas a 260 nM em espectrofotômetro (Eppendorf BioPhotometer – Eppendorf, Califórnia, EUA), sendo as concentrações de tRNA calculadas considerando-se a relação 1AU = 40 µg/mL, conforme a fórmula:

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

Serão consideradas adequadas razões 260RNA/280PROT 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 água 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) e fixando-se uma voltagem de 70V por aproximadamente 1 hora (até correr 2/3 do gel). Posteriormente os géis foram revelados sob luz ultravioleta (UV) e as imagens capturadas pelo detector de imagem Chim-Imager 5500 – Alpha Innotech Corporation. O tempo de exposição será ajustado pela auto exposição do aparelho (exposição normal para saturação da

imagem em torno de alguns milissegundos). Por fim, foram visualizadas as bandas 28S e 18S, indicadoras da integridade do RNA.

Para a reação de transcrição do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA), cuidadosamente, 4µL de tRNA (amostra) foram avolumadas para 10 µL de água DEPC inativa 0,01%. Esta solução foi aquecida a 65⁰C por 5 min seguida por choque térmico com gelo. A esta solução foi adicionado 10µL 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 – 10mM 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 (0,1M), 1 µL de RNase OUT (40U/µL) e por último 1 µL de enzima Superscript II (200 U/µL). A fim de assegurar a ausência de DNA na amostra, foram utilizados controles negativo consistindo de “pool” de RNAs contendo todos os reagentes citados anteriormente com omissão da Superscript II. A mistura foi homogeneizada e incubada a 42⁰C durante 50 min em banho-maria e depois incubada a 70⁰C durante 15 min em banho-maria para inativação da enzima. As amostras foram mantidas a -20⁰C 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 (10⁻⁵M), 0,5 µL do oligonucleotídeo antisense (10⁻⁵M); 4,25 µL de água DEPC autoclavada 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, 6mM MgCL₂, 400 µM dGTP, 400 µM dATP, 400 µM d 400 µM dCTP, 800 µM UTP, uracil DNA glicosilase (UDG) e agentes estabilizadores.

Os oligonucleotídeos para PAR₁, PAR₂, gingipaina e P3 foram extraídos do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) e desenhados com o auxílio do software Primer3. As sequências geradas neste programa também foram analisadas no Blast quanto à especificidade e tamanho do fragmento. A sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do cDNA bem como o número de acesso ao GenBank está apresentada na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Sequência de oligonucleotídeos usados para amplificação do cDNA

Gene	Forward (F) and Reverse (R) sequences	GenBank accession	Fragment size
PAR ₁ (F)	5'-AGTCTGTGCGGCCCCGCTGTT-3'	NM_001992.3	90pb
PAR ₁ (R)	5'-AAATGACCGGGGATCTAAGGTGGCA-3'		
PAR ₂ (F)	5'-TGCTAGCAGCCTCTCTCTCC-3'	NM_005242.4	92pb
PAR ₂ (R)	5'-TGTGCCATCAACCTTACCAA-3'		
P3(F)	5'-TCTGCTTCGGAGACTCAGGT-3'	NM_002777.3	111pb
P3 (R)	5'-GCGTGAAGAAGTCAGGGAAA-3'		
GAPDH (F)	5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3'	NM_002046	80pb
GAPDH (R)	5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'		
Gingipain (F)	5'-CCTACGTGTACGGACAGAGCTATA-3'	NC_010729	70pb
Gingipain (R)	5'-AGGATCGCTCAGCGTAGCATT-3'		
16S Ribosomal (F)	5'-TCGGTATTGAGGAAGGTTGG-3'	NC_015571	86pb
16S Ribosomal (R)	5'-CTGCTGGCACGGAGTTAG-3'		

As condições de PCR utilizadas para amplificar GAPDH, PAR₁, PAR₂, gingipaina e P3 foram: 2 min a 50°C, 2 min a 95°C; seguindo-se 40 ciclos na seguinte sequência: 15 seg. a 95°C, 1 min à temperatura de anelamento (ver tabela acima) e 20 seg. 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 $\Delta\Delta C_t$ ("cycle threshold"). A expressão gênica do 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 (normalizadas pelo GAPDH).

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 SYBER green confirmada pela curva de dissociação. A linearidade e eficiência do teste foram avaliadas previamente através da curva de diluição da amostra, pois, partindo-se 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 apresentaram inclinação e eficiência próxima ao ótimo (-3,322 e 1 respectivamente). Este procedimento indica a eficiência dos oligonucleotídeo e a melhor diluição do produto de Rt a ser utilizada nos ensaios.

4.6 Análise estatística

As comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste estatístico ANOVA. Nos casos em que houve diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos, foram realizadas comparações post-hoc entre pares por meio de teste estatístico Tukey-Kramer.

As análises e os gráficos do presente estudo foram realizadas com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism versão 4.0. Os dados presentes nos gráficos foram expressos como média + SEM (erro padrão da média). Foram utilizadas as médias de dados obtidos para cada paciente, desta forma utilizando o paciente, e não o sítio periodontal, como unidade de análise.

5 RESULTADOS

5.1 Dados demográficos e parâmetros clínicos periodontais

Para este estudo foram recrutados indivíduos sistemicamente saudáveis sem periodontite crônica que foram alocados no grupo Controle, diabéticos periodontalmente saudáveis alocados no grupo Diabetes, diabéticos com periodontite crônica no grupo DPC e indivíduos sistemicamente saudáveis com periodontite crônica no grupo PC.

Conforme a tabela 5.1, o grupo Controle foi composto de 30 indivíduos, 16 mulheres e 14 homens, com média de idade de 43,97 anos. O grupo Diabetes foi composto de 30 indivíduos, 16 mulheres e 14 homens, com média de idade de 55 anos e de hemoglobina glicada de 7,3%. O grupo PC foi composto de 30 indivíduos, 16 mulheres e 14 homens e média de idade de 44,47 anos. O último grupo, DPC, composto de 30 indivíduos, 15 homens e 15 mulheres, média de idade 55,43 anos e hemoglobina glicada de 7,77%.

Tabela 5.1 - Dados demográficos e parâmetros clínicos periodontais dos grupos, no baseline e seis semanas após o tratamento periodontal não cirúrgico

Grupos (Média ± DP)						
Não Diabéticos			Diabéticos			
Características	Controle	Periodontite (PC)		Diabetes	Periodontite (DPC)	
N	30	30		30	30	
Idade (anos)	43,97 ± 9,17	44,47 ± 9,17		55,00 ± 8,50**	55,43 ± 8,56**	
20 – 30 (N)	2	1		0	0	
31 – 45 (N)	21	13		6	5	
46 – 60 (N)	10	13		18	15	
61 – 75 (N)	2	2		6	10	
Sexo (F/M)	16/14	16/14		16/14	15/15	
Parâmetros periodontais		Baseline	Após o tratamento		Baseline	Após o tratamento
Média PCS (mm)	1,83 ± 0,26	2,95 ± 0,63*	2,21 ± 0,78†	2,1 ± 0,3	3,16 ± 0,40*°	2,55 ± 0,75†
Média NCI (mm)	2,07 ± 0,32	3,78 ± 0,70*	3,13 ± 1,11†	2,6 ± 0,6	4,16 ± 0,91*°	3,59 ± 0,92†
Média SS (%)	3,83 ± 2,98	62,79 ± 23,48*	14,78 ± 20,01†	11,63 ± 10,31	39,56 ± 18,21*°	13,31 ± 15,12†
Média IP (%)	15,15 ± 0,14	83,01 ± 12,01*	16,59 ± 24,27†	15,30 ± 6,74	72,97 ± 14,30*°	13,09 ± 11,78†
HbA_{1c} (%)	-	-	-	7,3 ± 1,0	7.7±0.88	7.46±1.83
≤ 7.5% (N)	-	-	-	16	13	15
> 7.5% (N)	-	-	-	14	17	15

N: número de participantes; DP: desvio padrão; PCS: profundidade clínica de sondagem; NCI: nível clínico de inserção, SS: sangramento à sondagem; IP: índice de placa; HbA_{1c}: hemoglobina glicada; * Diferença estatística em relação ao grupo Controle (p<0.05); °Diferença estatística em relação ao grupo Diabetes (p<0.05); † Diferença estatística em relação ao baseline (p<0.05); *Diferença estatística em relação ao grupo PC

A média de idade dos pacientes diabéticos foi significativamente maior ($p<0.001$) que o grupo Controle e que o grupo PC (Tabela 5.1).

No início do estudo, as médias dos parâmetros periodontais PCS, NCI, SS e IP foram significativamente maiores ($p<0.001$) nos indivíduos não diabéticos com periodontite crônica (PC) quando comparados com indivíduos do grupo Controle, e nos indivíduos diabéticos com periodontite crônica (DPC) quando comparados com indivíduos do grupo Controle e grupo Diabetes. Após o tratamento periodontal não cirúrgico, os grupos PC e DPC apresentaram melhora significativa ($p<0.05$) de todos os parâmetros avaliados: PCS, NCI, SS e IP (Tabela 5.1).

E como demonstrado na tabela 5.1, o tratamento periodontal resultou em diminuição não significativa ($p>0,05$) dos valores de HbA_{1c}, nos diabéticos com periodontite crônica (DPC), quando comparados com o baseline (7,77% no baseline versus 7,46% no pós-tratamento).

Tabela 5.2 - Parâmetros Periodontais dos sítios coletados de todos os grupos, no baseline e após o tratamento periodontal não cirúrgico.

Sítios - Média $\pm$ DP						
Parâmetros Clínicos	Não diabéticos			Diabéticos		
	Controle	Periodontite (CP)		Diabetes	Periodontite (DCP)	
		Baseline	Após o tratamento		Baseline	Após o tratamento
PCS (mm)	2,11 $\pm$ 0,40	5,55 $\pm$ 1,25*	3,39 $\pm$ 0,89†	2,2 $\pm$ 0,4	5,21 $\pm$ 0,78*°	3,01 $\pm$ 0,61†
NCI (mm)	2,16 $\pm$ 0,44	6,53 $\pm$ 1,52*	4,74 $\pm$ 1,28†	2,7 $\pm$ 0,7	5,90 $\pm$ 1,06*°	4,03 $\pm$ 1,24
SS (%)	0 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0*	25,93 $\pm$ 34,30†	7,06 $\pm$ 15,71	56,67 $\pm$ 25,35*°	21,67 $\pm$ 19,92†
IP (%)	7,5 $\pm$ 11,75	98,96 $\pm$ 5,10*	29,17 $\pm$ 30,10†	14,32 $\pm$ 18,39	72,73 $\pm$ 31,33*°	21,82 $\pm$ 22,72†

DP: desvio padrão; PCS: profundidade clínica de sondagem; NCI: nível clínico de inserção, SS: sangramento à sondagem; IP: índice de placa; * Diferença estatística em relação ao grupo Controle ($p<0.05$); °Diferença estatística em relação ao grupo Diabetes ($p<0.05$); † Diferença estatística em relação ao baseline ($p<0.05$).

Além disso, de acordo com a tabela 5.2, os parâmetros PCS, NCI, SS e IP dos sítios coletados foram significativamente maiores ($p < 0.001$) no grupo de indivíduos não diabéticos com periodontite crônica (PC) quando comparados com o grupo Controle, e no grupo de indivíduos diabéticos com periodontite crônica (DPC) quando comparados o grupo Controle e o grupo Diabetes. Após o tratamento periodontal não cirúrgico, houve melhora significativa ($p < 0.001$) de todos os parâmetros, em ambos os grupos, exceto o NCI que no grupo de diabéticos com periodontite crônica (DPC), não apresentou diferença estatística significativa em relação ao baseline ($p > 0.05$).

5.2 Expressão gênica de PAR₁ no fluido gengival

A expressão gênica de PAR₁ no fluido gengival de pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite crônica (PC) foi menor ($p < 0,05$) quando comparada ao grupo Controle (Figura 5.1).

Em diabéticos sem periodontite crônica (Diabetes), a expressão gênica do PAR₁ no fluido gengival foi significantemente maior em relação ao Controle ($p < 0,05$). Em pacientes diabéticos com periodontite crônica (DPC), a expressão gênica de PAR₁ no fluido gengival foi significantemente menor ($p < 0,05$) quando comparada com diabéticos sem periodontite crônica (Diabetes) (Figura 5.1).

O tratamento periodontal levou ao aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão de PAR₁ em diabéticos (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Expressão gênica de PAR₁ em células do FG, antes e após tratamento periodontal não cirúrgico. *Diferença estatística em relação ao grupo Controle (não diabéticos com saúde periodontal) ($p < 0.05$) °Diferença estatística em relação ao grupo Diabetes (diabéticos com saúde periodontal) ($p < 0.05$) •Diferença estatística em relação ao Baseline ($p < 0.05$)

5.3 Expressão gênica de PAR₂ no fluido gengival

Pacientes não diabéticos com periodontite crônica (PC) apresentaram a expressão gênica de PAR₂ no fluido gengival significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparada com o grupo Controle (Figura 5.2).

Em pacientes diabéticos com periodontite crônica (DPC) a expressão gênica de PAR₂ estava significativamente diminuída ($p < 0,05$) quando comparada com diabéticos sem periodontite crônica (Diabetes) e significativamente diminuída ($p < 0,05$) quando comparada com não diabéticos com periodontite crônica (PC) (Figura 5.2).

O tratamento periodontal levou a um aumento significativo ($p < 0,05$) de PAR₂ em diabéticos com periodontite crônica (DPC), e a uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em não diabéticos com periodontite crônica (PC) (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Expressão gênica de PAR₂ em células do FG, antes e após tratamento periodontal não cirúrgico. *Diferença estatística em relação ao grupo Controle (não diabéticos com saúde periodontal) ($p < 0.05$) °Diferença estatística em relação ao grupo Diabetes (diabéticos com saúde periodontal) ($p < 0.05$) ●Diferença estatística em relação ao Baseline ($p < 0.05$), ■ Diferença estatística em relação ao baseline de não diabéticos com periodontite crônica ($p < 0.05$)

5.4 Expressão gênica de gingipaina no fluido gengival

A expressão gênica de gingipaina no fluido gengival de pacientes não diabéticos com periodontite crônica (PC) foi significativamente maior ($p < 0,05$) que o Controle (Figura 5.3).

Indivíduos diabéticos com periodontite crônica (DPC) apresentaram a expressão gênica de gingipaina no fluido gengival aumentada ($p < 0,05$) em relação aos indivíduos com diabetes sem periodontite crônica (Diabetes) (Figura 5.3).

O efeito do tratamento periodontal não cirúrgico levou a diminuição significativa ($p < 0,05$) de gingipaina no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica, diabéticos e não diabéticos (Figura 5.3).

Figura 5.3 - Expressão gênica de gingipaina em células do FG, antes e após tratamento periodontal não cirúrgico. *Diferença estatística em relação ao grupo Controle (não diabéticos com saúde periodontal) ($p < 0.05$) °Diferença estatística em relação ao grupo Diabetes (diabéticos com saúde periodontal) ($p < 0.05$) •Diferença estatística em relação ao Baseline ($p < 0.05$)

5.5 Expressão gênica de P3 no fluido gengival

A expressão gênica de P3 no fluido gengival de pacientes não diabéticos com periodontite crônica (PC) foi significativamente maior ($p < 0,05$) que o Controle (Figura 5.4).

Em pacientes diabéticos com periodontite crônica (DPC), a expressão gênica de P3 no fluido gengival foi significativamente maior ($p < 0,05$) que diabéticos sem periodontite crônica (Diabetes), e significativamente menor ($p < 0,05$) que não diabéticos com periodontite crônica (PC) (Figura 5.4).

O tratamento periodontal levou a diminuição significativa ($p < 0,05$) de P3 no fluido gengival de diabéticos e não diabéticos com periodontite crônica (DPC e PC) (Figura 5.4)

Figura 5.4 - Expressão gênica de P3 em células do FG, antes e após tratamento periodontal não cirúrgico. *Diferença estatística em relação ao grupo Controle (não diabéticos com saúde periodontal) ($p < 0.05$) °Diferença estatística em relação ao grupo Diabetes (diabéticos com saúde periodontal) ($p < 0.05$) •Diferença estatística em relação ao Baseline ($p < 0.05$), ▪ Diferença estatística em relação ao baseline de não diabéticos com periodontite crônica ($p < 0.05$)

6 DISCUSSÃO

Este estudo foi conduzido para avaliar a influência do diabetes *mellitus* do tipo 2 na expressão gênica dos receptores PAR₁ e PAR₂ no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica. Nós demonstramos que pacientes diabéticos apresentam uma maior expressão de PAR₁ no fluido gengival e que na presença da periodontite crônica a expressão de PAR₂ encontra-se diminuída nesses pacientes. A maior expressão de PAR₁ nos indivíduos diabéticos do presente estudo está de acordo com estudos prévios, que demonstraram que o estado hiperglicêmico característico desses indivíduos pode levar ao aumento da expressão de PAR₁, por levar ao aumento da produção de trombina, seu principal ativador (Ferroni et al., 2004; Coughlin, 2005).

Na presença da periodontite crônica, diabéticos e não diabéticos apresentaram uma menor expressão do PAR₁ no fluido gengival, sendo que após o tratamento periodontal essa expressão aumentou. Bueno da Silva et al. (2014) também encontraram os mesmos resultados em um estudo com pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite crônica. Os pesquisadores demonstraram a diminuição da expressão de PAR₁ na presença de inflamação, e aumento da expressão desse receptor no fluido gengival após o tratamento periodontal, e sugerem que esse receptor apresenta um papel protetor durante o reparo tecidual periodontal. Sabe-se também que a ativação de PAR₁ em células do ligamento periodontal, pela trombina, induz a síntese de OPG, uma proteína que pode inibir a diferenciação e função de osteoclastos. (Arayatrakoolikit et al., 2008). A trombina via PAR₁, também pode induzir a proliferação de fibroblastos gengivais de ratos (Ohuchi et al., 2010), e regular a atividade da ciclooxigenase (COX2) imediatamente após injúria, induzindo a liberação de diversos fatores de crescimento, tais como VEGF, FGF-1 e -2, CTGF e, TGFβ-1 (Pagel et al., 2009).

Pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite crônica apresentaram maior expressão de PAR₂, e relacionamos esse resultado com a presença exacerbada das proteases ativadoras gingipaina e P3 no fluido gengival. Após o tratamento periodontal, houve uma redução significativa das expressões da gingipaina e da P3, que consequentemente levou a diminuição da expressão do

PAR₂ no fluido gengival. Resultados similares foram demonstrados *in vivo* e em humanos por Holzhausen et al. (2005a); Holzhausen et al. (2010); Fagundes et al. (2011) e Euzebio Alves et al. (2014), que demonstraram que a ativação de PAR₂ leva à inflamação dos tecidos periodontais, e que células epiteliais e leucócitos presentes no fluido gengival, influenciam a expressão desse receptor na presença das proteases gingipaina e P3.

Pacientes diabéticos com periodontite crônica apresentaram menor expressão de PAR₂ e de P3 no fluido gengival. Após o tratamento periodontal, a expressão gênica de PAR₂ aumentou e a expressão gênica de P3 diminuiu no fluido gengival. Sabe-se que neutrófilos são células que expressam o PAR₂ no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica (Euzebio Alves et al., 2014), e que em diabéticos, essas células apresentam a atividade quimiotática e a liberação de enzimas comprometidas (Iacono et al., 1995). Desta maneira, acreditamos que pelo fato de neutrófilos serem hipofuncionais (Mealey; Ocampo, 2007) e se apresentarem em número reduzido na bolsa periodontal em diabéticos (Engebretson et al., 2006), possa ocorrer uma menor liberação da P3 neste ambiente e, conseqüentemente, menor ativação e expressão de PAR₂. Segundo Ossovskaya; Bunnett (2004), para que uma protease clive e ative o receptor, ela precisa ser produzida e liberada em concentração suficiente para ativar o receptor.

Nosso estudo também demonstrou uma melhora significativa em todos os parâmetros clínicos periodontais estudados, tanto em diabéticos quanto não diabéticos, após o tratamento periodontal não cirúrgico. Ainda, houve redução, apesar de não significativa, dos níveis da hemoglobina glicada nos diabéticos com periodontite crônica após o tratamento periodontal. Sabe-se que a resposta inflamatória significativa na periodontite crônica pode contribuir para a exacerbação do diabetes, uma vez que contribui para a resistência à insulina e para desregulação da glicemia. A hipótese de que o tratamento da periodontite crônica resulte em melhora do controle glicêmico parece ser biologicamente plausível uma vez que o tratamento periodontal não cirúrgico pode estabilizar a condição periodontal, e desta maneira contribuir para a melhora do controle glicêmico no paciente diabético (Lalla e Papapanou, 2011). A revisão sistemática conduzida por Engebretson et al. (2013) concluiu que uma modesta redução da HbA_{1c} é observada como resultado do tratamento periodontal em pacientes com DMT2, e a meta-análise conduzida por

Sgolastra et al. (2013) concluiu que o tratamento periodontal é efetivo na melhora do controle glicêmico, mas que estudos futuros são necessários para confirmar esse resultado.

A melhora observada no presente estudo pode não ter sido significativa do ponto de vista estatístico, mas clinicamente é bem importante porque os dados sugerem que uma redução de 0.20% no nível da HbA_{1c} está associada com uma redução de 10% da mortalidade de indivíduos diabéticos (Lalla; Papapanou, 2011).

7 CONCLUSÃO

Acreditamos que nosso trabalho é um dos primeiros a demonstrar a expressão gênica dos receptores ativados por protease do tipo 1 e do tipo 2 em pacientes diabéticos com periodontite crônica.

Dentro dos limites do presente estudo concluímos que:

- 1 - O diabetes levou ao aumento da expressão gênica do PAR₁ no fluido gengival de pacientes sem periodontite crônica quando comparados com pacientes sistemicamente saudáveis sem periodontite crônica. Na presença da periodontite crônica, o diabetes levou à diminuição da expressão de ambos os receptores (PAR₁ e PAR₂).
- 2 - O tratamento periodontal não cirúrgico levou ao aumento da expressão gênica do PAR₁ e do PAR₂ no fluido gengival de pacientes diabéticos.
- 3 - O diabetes não teve nenhum efeito sobre a expressão da gingipaina, mas, na presença de periodontite crônica, levou a uma diminuição significativa da P3. Ainda, o tratamento periodontal não cirúrgico, levou a uma diminuição significativa de ambas as proteases.

Nossos dados sugerem a importância dos receptores PAR₁ e PAR₂ na periodontite crônica de pacientes com diabetes. Contudo, futuros estudos são necessários para elucidar os exatos mecanismos que medeiam os efeitos dos PARs durante a inflamação e o reparo dos tecidos periodontais em diabéticos.

REFERÊNCIAS¹

AAP – American Academy of Periodontology 1999. International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. Ann Periodontol. 1999; 4(1):i, p. 1-112.

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.

ADA Data from the 2011 National Diabetes Fact Sheet (released Jan. 26, 2011). Centers for Disease Control and Prevention: National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States. Atlanta: U.S: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2011.

Aemaimanan P, Amimanan P, Taweechaisupapong S. Quantification of key periodontal pathogens in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with generalized chronic periodontitis. Anaerobe. 2013 Aug;22:64-8.

Araujo MW, Hovey KM, Benedek Jr, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. J Periodontol 2003;74 (12), p.1736-40

Arayatrakoollikit U, Pavasant P, Yongchaitrakul T. Thrombin induces osteoprotegerin synthesis via phosphatidylinositol 3'-kinase/mammalian target of rapamycin pathway in human periodontal ligament cells. J Periodontal Res. 2008;Oct;43(5):537-43

Austin KM, Covic L, Kuliopulos A. Matrix metalloproteases and PAR1 activation. Blood. 2013 Jan 17;121(3):431-9

Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. Arq Bras EndocrinolMetab 2008;52(6):940-50.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Belibasakis GN, Bostanci N, Reddi D. Regulation of protease-activated receptor-2 expression in gingival fibroblasts and Jurkat T cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Biol Int*. 2010 Feb 5;34(3):287-92.

Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol* 2000. 2011 Feb;55(1):36-47.

Bueno da Silva HA, Euzebio Alves VT, Spolidório LC, César Neto JB, Eichler RS, Catelli de Carvalho MH, Holzhausen M. Expression of Protease Activated Receptor-1 in Chronic Periodontitis. *J Periodontol*. 2014 Jul 24:1-13. [Epub ahead of print]

Cheung WM, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, Damiano BP. Altered vascular injury responses in mice deficient in protease-activated receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Dec;19(12):3014-24.

Cocks TM, Moffatt JD. Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends PharmacolSci* 2000;21(3):103-8

Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):258-64.

Coughlin SR, Camerer E. PARTICipation in inflammation. *J Clin Invest* 2003; 111(1):25-7.

Dennison DK, Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000. 1997 Jun;14:54-78.

Déry O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol*. 1998 Jun;274 (6Pt1): C1429-52.

Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*. 2007 Mar;127(3):514-25.

Engelbrektson SP, Vossughi F, Hey-Hadavi J, Emingil G, Grbic JT. The influence of diabetes on gingival crevicular fluid beta-glucuronidase and interleukin-8. *J Clin Periodontol*. 2006 Nov;33(11):784-90.

Engelbrecht SP, Hyman LG, Michalovicz BS, Schoenfeld ER, Gelato MC, Hou W, Seaquist ER, Reddy MS, Lewis CE, Oates TW, Tripathy D, Katancik JA, Orlander PR, Paquette DW, Hanson NQ, Tsai MY. The effect of nonsurgical periodontal therapy on hemoglobin A1c levels in persons with type 2 diabetes and chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2013 Dec 18;310(23):2523-32.

Euzébio Alves VT, Bueno da Silva HA, de França BN, Eichler RS, Saraiva L, de Carvalho MH, Holzhausen M. Periodontal treatment downregulates protease-activated receptor 2 in human gingival crevicular fluid cells. *Infect Immun*. 2014 Mar;82(3):1354

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

Farzad P, Andersson L, Nyberg J. Dental implant treatment in diabetic patients. *Implant Dent*. 2002;11(3):262-7.

Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology* 2000. 2006;40:50-76.

Ferroni P, Basili S, Falco A, Davì G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost*. 2004 Aug;2(8):1282-91.

Giacaman RA, Asrani AC, Ross KF, Herzberg MC. Cleavage of protease-activated receptors on an immortalized oral epithelial cell line by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. *Microbiology*. 2009 Oct;155(Pt 10):3238-46.

Gremmel T, Kopp CW, Seidinger D, Koppensteiner R, Steiner S, Panzer S. Impact of diabetes on platelet activation in different manifestations of atherosclerosis. *Swiss Med Wkly*. 2013 May 28;143:w13800.

Guo Y, Nguyen KA, Potempa J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontol* 2000. 2010 Oct;54(1):15-44.

Hirano K, Kanaide H. Role of protease-activated receptors in the vascular system. *J Atheroscler Thromb*. 2003;10(4):211-25.

Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N. Proteinase-activated Receptor-2 (PAR2) Agonist Causes Periodontitis in Rats. *J Dent Res* 2005a;84(2):154-9.

Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N. Role of protease-activated receptor-2 in inflammation, and its possible implications as a putative mediator of periodontitis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005b;100Suppl 1:177-80.

Holzhausen M, Spolidorio LC, Ellen RP, Jobin MC, Steinhoff M, Andrade-Gordon P, et al. Protease-activated receptor-2 activation: a major role in the pathogenesis of *Porphyromonas gingivalis* infection. *Am J Pathol* 2006;168(4):1189-99.

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

Hyun E, Ramachandran R, Cenac N, Houle S, Rousset P, Saxena A, Liblau RS, Hollenberg MD, Vergnolle N. Insulin modulates protease-activated receptor 2 signaling: implications for the innate immune response. *J Immunol*. 2010 Mar 1;184(5):2702-9

IDF - International Diabetes Federation [online] 2013 [cited 2013 nov 06] Available from <http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figure>

Iacono VJ, Singh S, Golub LM, Ramamurthy NS, Kaslick R. In vivo assay of crevicular leukocyte migration. Its development and potential applications. *J Periodontol*. 1995 Nov;56(11Suppl):56-62.

Ishibashi Y, Matsui T, Ueda S, Fukami K, Yamagishi S. Advanced glycation end products potentiate citrated plasma-evoked oxidative and inflammatory reactions in endothelial cells by up-regulating protease-activated receptor-1 expression. *Cardiovasc Diabetol*. 2014 Mar 13;13(1):60.

Jaffré F, Friedman AE, Hu Z M B β -adrenergic receptor stimulation transactivates protease-activated receptor 1 via matrix metalloproteinase 13 in cardiac cells. *Circulation*. 2012 Jun 19;125(24):2993-3003

Kessenbrock K, Dau T, Jenne DE. Tailor-made inflammation: how neutrophil serine proteases modulate the inflammatory response. *J Mol Med (Berl)*. 2011 Jan;89(1):23-8.

Kinane DF, Mooney J, Ebersole JL. Humoral immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1999 Jun;20:289-340.

King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1527-34.

Lakschevitz, F., Aboodi, G., Tenenbaum, H. ; Glogauer, M. Diabetes and periodontal diseases: interplay and links. *Current Diabetes Rev* 2011;7,433–39.

Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM. Hyperglycemia, glycoxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontol* 2000. 2000 Jun;23:50-62.

Lalla E, Papapanou PN. *Nat Rev Endocrinol*. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. 2011;Jun 28;7(12):738-48.

Lenox, JA.; Kopczyk, RA. A clinical system for scoring a patients oral hygiene performance. *J. Am. Dent.* 1973;86:849-52

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.

Listgarten MA, Ricker FH Jr, Laster L, Shapiro J, Cohen DW. Vascular basement lamina thickness in the normal and inflamed gingiva of diabetics and non-diabetics. *J Periodontol* 1974;45:676-84

Löe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1993 Jan;16(1):329-34.

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 Lett*. 1998 Sep 11;435(1):45-8.

Lourbakos, A et al. Activation of protease –activated receptors by gingipain from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. *Blood* 2001a;97,3790-97.

Lourbakos A, Potempa J, Travis J, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, Santulli R, et al. Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates

protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun* 2001b;69(8):5121-30

Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2001 Jun;53(2):245-82.

Manouchehr-Pour M, Spagnuolo PJ, Rodman HM, Bissada NF. Impaired neutrophil chemotaxis in diabetic patients with severe periodontitis. *J Dent Res* 1981;60:729-30.

Matsumoto T, Ishida K, Taguchi K, Kobayashi T, Kamata K. Mechanisms underlying enhanced vasorelaxant response to protease-activated receptor 2-activating peptide in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat mesenteric artery. *Peptides*. 2009 Sep;30(9):1729-34.

Mealey, BL; Oates, TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J. Periodontol*. 2006; 77:1289–1303.

Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007;44:127-53.

Nelson RG, Shlossman M, Budding LM, Pettitt DJ, Saad MF, Genco RJ, Knowler WC. Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care*. 1990 Aug;13(8):836-40.

Noorbakhsh F, Vergnolle N, Hollenberg MD, Power C. Proteinase-activated receptors in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Dec;4(12):981-90.

Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(20):9208-12.
O'Brien PJ, Molino M, Kahn M, Brass LF. Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene*. 2001 Mar 26;20(13):1570-81.

Ohuchi N, Hayashi K, Iwamoto K, Koike K, Kizawa Y, Nukaga M, Kakegawa T, Murakami H. Thrombin-stimulated proliferation is mediated by endothelin-1 in cultured rat gingival fibroblasts. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010 Aug;24(4):501-8.

O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol*. 1972 Jan;43(1):38.

Oringer RJ; Research, Science, and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Modulation of the host response in periodontal therapy. *J Periodontol*. 2002 Apr;73(4):460-70.

Ossovskaya VS, Bunnet NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*. 2004;84: 579-62.

Pagel CN, Song SJ, Loh LH, Tudor EM, Murray-Rust TA, Pike RN, Mackie EJ. Thrombin-stimulated growth factor and cytokine expression in osteoblasts is mediated by protease-activated receptor-1 and prostanoids. *Bone*. 2009 May;44(5):813-21.

The pathogenesis of periodontal diseases. Academy reports. *J Periodontol*. 1999 Apr;70(4):457-70.

Pham CT. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jul;6(7):541-50.

Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis: oral complication of diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013 Dec;42(4):849-67.

Roviezzo F, Bucci M, Brancaleone V, Di Lorenzo A, Geppetti P, Farneti S, Parente L, Lungarella G, Fiorucci S, Cirino G. Proteinase-activated receptor-2 mediates arterial vasodilation in diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Nov;25(11):2349-54

Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:173-201.

Salvi GE, Carollo-Bittel B, Lang NP. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):398-409.

Samad F, Ruf W. Inflammation, obesity, and thrombosis. *Blood*. 2013 Nov 14;122(20):3415-22.

Sgolastra F, Severino M, Pietropaoli D, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of periodontal treatment to improve metabolic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Periodontol*. 2013 Jul;84(7):958-73

Slots J. Periodontology: past, present, perspectives. *Periodontol* 2000. 2013 Jun;62(1):7-19.

Spolidorio LC, Ramalho Lucas PD, Steffens JP, da Silva HA, Tubero Euzebio Alves V, Palomari Spolidorio DM, Holzhausen M. Influence of parstatin on experimental periodontal disease and repair in rats. *J Periodontol*. 2014 Sep;85(9):1266-74.

Tanaka N, Morita T, Nezu A, Tanimura A, Mizoguchi I, Tojyo Y. Signaling mechanisms involved in protease-activated receptor-1-mediated interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Nov;311(2):778-86.

Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2002 Jun;30(3):182-92

Travis J, Potempa J. Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *BiochimBiophysActa*. 2000;1477(1-2):35-50

Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Sep;5(9):785-99.

Uehara A, Sugawara S, Muramoto K, Takada H. Activation of human oral epithelial cells by neutrophil proteinase 3 through protease-activated receptor-2. *J Immunol*. 2002 Oct 15;169(8):4594-603.

Uehara A, Muramoto K, Takada H, Sugawara S. Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through protease-activated receptor 2. *J Immunol*. 2003;170(11):5690-6

Uehara A, Muramoto K, Imamura T, Nakayama K, Potempa J, Travis J, Sugawara S, Takada H. Arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* stimulate production of hepatocyte growth factor (scatter factor) through protease-activated receptors in human gingival fibroblasts in culture. *J Immunol*. 2005 Nov 1;175(9):6076-84

Uehara A, Imamura T, Potempa J, Travis J, Takada H. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* synergistically induce the production of proinflammatory cytokines through protease-activated receptors with Toll-like receptor and NOD1/2 ligands in human monocytic cells. *Cell Microbiol*. 2008 May;10(5):1181-9.

Undas A, Wiek I, Stêpien E, Zmudka K, Tracz W. Hyperglycemia is associated with enhanced thrombin formation, platelet activation, and fibrin clot resistance to lysis in patients with acute coronary syndrome. *Diabetes Care*. 2008 Aug;31(8):1590-5.

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*. 2001 Jul;7(7):821-6.

Vergnolle N. Protease-activated receptors and inflammatory hyperalgesia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Mar;100 Suppl 1:173-6.

Vu TK, 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.

Wiedow O, Meyer-Hoffert U. Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation. *J Intern Med*. 2005 Apr;257(4):319-28.

Wong DM, Tam V, Lam R, Walsh KA, Tatarczuch L, Pagel CN, Reynolds EC, O'Brien-Simpson NM, Mackie EJ, Pike RN. Protease-activated receptor 2 has pivotal roles in cellular mechanisms involved in experimental periodontitis. *Infect Immun*. 2010 Feb;78(2):629-38. doi: 10.1128/IAI.01019-09. Epub 2009 Nov 23.

Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*. 2013 Aug 5;15:e7.

Yu S, Li H, Ma Y, Fu Y. Matrix metalloproteinase-1 of gingival fibroblasts influenced by advanced glycation end products (AGEs) and their association with receptor for AGEs and nuclear factor- κ B in gingival connective tissue. *J Periodontol*. 2012 Jan;83(1):119-26.

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

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“A influência do diabetes mellitus do tipo 2 na expressão dos receptores ativados por proteases do tipo 1 (PAR1) e do tipo 2 (PAR2) em células do fluido gengival de pacientes com periodontite crônica.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

LOCAL QUE SERÁ REALIZADO O ESTUDO: Clínica de pós-graduação da Faculdade de Odontologia da USP, localizada na Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária

A doença periodontal deixa a gengiva inchada, vermelha, sangrando e pode levar ao amolecimento e perda dos dentes. Essa é uma doença muito comum e é causada por bactérias (germes) da boca que vivem ao redor dos dentes e gengiva. As células da gengiva apresentam entre outras coisas, duas proteínas diferentes: a proteína PAR1 e a proteína PAR2, que podem estar associadas com a doença da gengiva. O objetivo desta pesquisa é avaliar se o diabetes mellitus do tipo 2 altera o funcionamento dessas proteínas.

Serão realizados: exame gengival, que visa saber a condição de sua gengiva; orientação de higiene bucal e o tratamento periodontal, que é a raspagem dos dentes para remover a placa e o tártaro acumulados. A raspagem será feita com anestesia local, se preciso. Iremos também recolher amostras de sangue e fluido da gengiva, antes e após o tratamento periodontal, para podermos medir a porcentagem da sua hemoglobina glicada e iremos também medir sua pressão arterial. Aproximadamente 1 mês após o término do primeiro tratamento iremos fazer um novo exame gengival e, se preciso, iremos complementar. A complementação do tratamento pode ser com apenas uma nova sessão de raspagem. A coleta do fluido gengival será feita antes e após o término do tratamento periodontal, com um pequeno filtro de papel que levemente será colocado dentro da sua gengiva. Esses procedimentos são seguros e não provocam dor, dano físico ou moral ao Sr. (a).

A pesquisa dará ao Sr. (a) o diagnóstico de sua condição periodontal, além do tratamento odontológico, que deve resultar na melhora da sua saúde bucal. Não haverá despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as informações dos outros voluntários, e não será divulgada a identificação de nenhum paciente. Como participante dessa pesquisa, o Sr. (a) terá acesso aos resultados obtidos e permitirá o acesso dos mesmos aos pesquisadores envolvidos e aos membros da Comissão de Ética. Os resultados desse trabalho poderão ser apresentados em congressos ou publicados em revistas científicas, sendo sua identidade sempre preservada. A qualquer tempo, o Sr.(a) terá acesso às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa. Além disso, terá direito à privacidade e todas as informações obtidas dos prontuários clínicos e ambulatoriais permanecerão confidenciais, nos âmbitos da lei, assegurando a proteção de sua imagem e identidade.

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.

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 FOU SP: Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária, (11) 3091-7830e também com o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP: Rua Botucatu, 572- 10 andar - conj. 14-CEP 04023-062-São Paulo/ Brasil. Telefone: (11) 5571-1062/ (11) 5539-7162..

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Quanto à utilização de seus dados ou amostra de fluido gengival, favor assinalar uma das alternativas:

() NÃO autorizo a utilização de dados ou amostras de meu fluido gengival em outra pesquisa. O mesmo será descartado após sua análise.

() SIM autorizo a utilização de dados ou amostras de fluido gengival em outra pesquisa

Para utilizar os dados ou amostras de fluido gengival em outra pesquisa, favor marcar uma das alternativas:

() SIM quero ser consultado da utilização dos meus dados ou amostras de fluido gengival em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa,

() NÃO quero ser consultado da utilização dos meus dados ou amostras de fluido gengival em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito desta pesquisa. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido nesta instituição.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

ANEXO B - Parecer Consubstanciado do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Influência do diabetes do tipo 2 sobre a expressão dos receptores ativados por protease do tipo 1 (PAR-1) e tipo 2 (PAR-2) em células do fluido gengival de pacientes com periodontite crônica

Pesquisador: Marinella Holzhausen Caldeira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 19739813.3.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 544.563

Data da Relatoria: 27/02/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto avaliará 60 pacientes portadores de Diabetes tipo 2 (30 com periodontite crônica generalizada e 30 periodontalmente saudáveis), e 60 pacientes sistemicamente saudáveis (30 com periodontite crônica e 30 sem periodontite crônica). Todos deverão apresentar idade entre 35 e 65 anos e no mínimo 15 dentes (excluindo o 3 molar).

Objetivo da Pesquisa:

O projeto visa avaliar a influência do diabetes sobre a expressão dos receptores ativados por protease do tipo 1 (PAR-1) e tipo 2 (PAR-2) em células do fluido gengival de pacientes com periodontite crônica

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não existem riscos.

O entendimento do mecanismo de ação desses receptores poderá levar ao desenvolvimento de

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 544.563

terapia

medicamentosa para prevenir e/ou tratar doenças

periodontais através de mecanismos bloqueadores ou até mesmo ativadores desses receptores.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa possível de ser realizada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O cronograma foi alterado, observando a metodologia apresentada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 27 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO C - Parecer do Comitê de Ética da UNIFESP

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

aumento da vascularização do tecido periodontal, metabolismo do colágeno, incluindo o aumento do fluxo do fluido crevicular gengival..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo, apresentando carta de aprovação do estudo no CEP- FOU SP.

TCLE: Apresentado adequadamente.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 8400,00.

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 25/6/2012 e 25/6/2013.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0643/11

RECOMENDAÇÃO DO CEP: ENCAMINHAR APROVAÇÃO DA FAPESP ASSIM QUE FOR OBTIDA