VANESSA TUBERO EUZEBIO ALVES

**Efeito da terapia periodontal sobre a expressão do receptor ativado por
protease do tipo 2 (PAR2) em pacientes com periodontite crônica**

São Paulo

2014

VANESSA TUBERO EUZEBIO ALVES

**Efeito da terapia periodontal sobre a expressão do receptor ativado por
protease do tipo 2 (PAR2) em pacientes com periodontite crônica**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Periodontia

Orientadora: Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

Co-orientador: Prof. Dr. Ibrahim Alpdogan Kantarci

São Paulo

2014

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

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

Alves, Vanessa Tubero Euzebio.

Efeito da terapia periodontal sobre a expressão do receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR2) em pacientes com periodontite crônica / Vanessa Tubero Euzebio Alves; orientadora Marinella Holzhausen Caldeira; co-orientador Ibrahim Alpdogan Kantarci -- São Paulo, 2014.

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

Tese (Doutorado) -- 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. Tratamento periodontal. 3. Enzimas. I. Caldeira, Marinella Holzhausen. II. Kantarci, Ibrahim Alpdogan. III. Título.

Alves VTE. Efeito da terapia periodontal sobre a expressão do receptor ativado por protease 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 Doutora 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: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Gostaria de dedicar esse trabalho aos meus amados pais, **Sílvia e José Márcio**.*

O amor de vocês, que se faz presente onde quer que eu esteja, transforma as minhas dificuldades em superação e em realização. A melhor parte da realização de mais um sonho é poder dividir a alegria de sonhar junto com vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Agradeço a **Deus**, por me conceder o tempo e as virtudes necessárias para a elaboração deste estudo.*

*Gostaria de agradecer especialmente à minha orientadora e amiga, Profa. Dra. **Marinella Holzhausen Caldeira**. A sua orientação impecável e profissionalismo refletem a grandiosidade deste trabalho. O seu grande conhecimento desperta nos seus alunos o interesse em aprender, e a sua motivação nos faz ir muito além do que poderíamos imaginar. Agradeço com carinho por todos esses anos de ótimo convívio, pelos ensinamentos e por toda influência positiva que teve em minha vida.*

*Agradeço também ao meu co-orientador Prof. Dr. **Alpdogan Kantarci** do Forsyth Institute, por ter me recebido em seu laboratório, e pela incrível experiência de fazer parte de sua equipe durante o ano de 2013. Muito obrigada pela confiança, pelos conhecimentos transmitidos e pela paciência.*

AGRADECIMENTOS

Aos Professores da disciplina de Periodontia da FOUSP: Prof. Titular **Giuseppe A. Romito**, Prof. Livre-docente **Giorgio De Micheli**, Prof. Livre-docente **Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima**, Prof. Livre-docente **Cláudio Mendes Pannuti**, Prof. Dr. **Marco Antônio Georgetti**, Prof. Dr. **João Batista C. Neto**, Profa. Dra. **Luciana Saraiva**, Profa. Dra. **Cristina C. Villar** e Profa. Dra. **Marina C. Conde**.

À Profa. Titular **Maria Helena Catelli de Carvalho** do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), muito obrigada por todo o incentivo. Foi um prazer aprender e trabalhar durante dois anos no seu laboratório.

Ao Prof. Associado **Marcelo Nicolás Muscará** do laboratório de Farmacologia Bioquímica dos Radicais Livres e Inflamação (ICB - USP) e à Profa. Titular **Marina Helena Cury Gallottini** da Disciplina de Patologia Bucal (FOUSP), pelas considerações na banca de qualificação.

À Profa Dra. **Hatice Hasturk** e Prof. Dr. **Thomas Van Dyke**, obrigada pela atenção e disponibilidade durante todo o desenvolvimento da pesquisa no Forsyth Institute.

À querida amiga **Rosangela Eichler**, agradeço muito a sua dedicação, e por dividir o seu conhecimento, o seu tempo e paciência durante as análises laboratoriais.

À toda a minha **família de Bento Quirino**, obrigada pelas orações, pela torcida e por vocês existirem na minha vida.

Aos amigos da pós-graduação **Henrique Bueno**, **Ieda Abreu** e **Henrique Fukushima**. Muito obrigada pela amizade e todo o apoio que me proporcionaram durante a realização deste trabalho.

À **Natalia Leal Vizoto**, minha mais nova melhor amiga, obrigada por ter dividido comigo todos os sentimentos possíveis durante o nosso tempo em Boston.

Aos amigos do Forsyth Institute: **Aggasit Manosudprasit, Dani Stephens, Daniel Nguyen, Yannis Koroneos, Olivia Nguyen, Marcelo Freire, Bruno Herrera, Neele Stuhr-Wulff, Shevali Kansal**, e aos **Profs. Drs. Flavia e Ricardo Teles**, obrigada pelos conhecimentos divididos, por todo apoio e amizade.

Às amigas queridas **Lívia Perussi, Tatiana Miranda, Geisla Soares, Luciana Brito, Reila Mendes, Fabiana Rizzi, Verônica de Carvalho, Cassia Fukuda, Priscila Corraini e Danielle Vendramel**, a vida é mais alegre e doce com a amizade de vocês.

Aos amigos **Paula Farini e Pérsio Cezzarino**, obrigada por saber que posso contar sempre com vocês.

Aos alunos de iniciação científica **Bruno de França, Mayara Souza e Mayta Palomari** obrigada pela fidelidade e desprendimento nas etapas em que participaram desta pesquisa.

Às secretárias do Departamento: **Márcia Maria dos Santos, Marília Camargo, Cecília Forte Muniz, Nina Mascarenhas e Regina Santos** pela atenção e colaboração.

Às secretárias da Pós-Graduação **Cátia Tiezzi e Alessandra Moreira** pela atenção com que sempre me receberam.

À **Glauci Fidelis**, pelas correções e formatação deste trabalho.

Aos **pacientes**, que tornaram este estudo possível.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela bolsa de doutorado processo nº 2010/20477-8 e bolsa de estagio de pesquisa no exterior (BEPE) processo nº 2012/22439-1.

“A sabedoria é a meta da alma humana; mas a pessoa, à medida que em seus conhecimentos avança, vê o horizonte do desconhecido cada vez mais longe.”

Heráclito

RESUMO

Alves VTE. Efeito da terapia periodontal sobre a expressão do receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR2) em pacientes com periodontite crônica [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

O receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR2) está envolvido na patogênese de doenças inflamatórias crônicas, incluindo a periodontite. O PAR2 pode ser ativado pela gingipaína, produzida pela *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) e proteinase 3 (P3) do neutrófilo. A ativação do PAR2 desempenha um papel relevante nos processos inflamatórios ao induzir a liberação de importantes mediadores pró-inflamatórios associados à destruição periodontal. No presente estudo, o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico na expressão do PAR2 por células do fluido gengival, bem como a sua associação com os níveis de mediadores pró-inflamatórios e proteases ativadoras foram investigados em pacientes com periodontite. Além disso, avaliou-se *in vitro* o envolvimento da via de sinalização MAPK-p38 na ativação do PAR2 e a influência deste na produção de superóxido (O_2^-) e na capacidade de fagocitose em neutrófilos do sangue periférico humano infectados pela *P. gingivalis*. Um aumento significativo ($P < 0,05$) da expressão do RNAm e proteica do PAR2 por células do fluido gengival foi positivamente associado aos parâmetros clínicos inflamatórios e aos níveis de interleucina (IL)-6, IL-8, fator de necrose tumoral- α , metaloproteinases da matriz (MMP)-2, MMP-8, fator de crescimento de hepatócitos e fator de crescimento endotelial vascular, avaliados por Bioplex. Níveis elevados de RNAm da gingipaína e P3, expressão reduzida do RNAm da dentilisina ($P < 0,05$), bem como redução significativa ($P < 0,05$) dos níveis de inibidores de protease secretados por leucócitos e elafina (avaliados por ELISA), também foram associados à superexpressão do PAR2. Sítios periodontalmente saudáveis de indivíduos com periodontite crônica apresentaram uma menor expressão do RNAm e proteica do PAR2 ($P < 0,05$). O tratamento periodontal resultou na diminuição significativa da expressão de PAR2 ($P < 0,05$), correlacionada com a diminuição da expressão de mediadores inflamatórios ($P < 0,05$), bem como com suas proteases ativadoras ($P < 0,05$). Além disso, o uso do antagonista do PAR2 suprimiu significativamente ($P < 0,05$) a produção de superóxido em neutrófilos do sangue periférico humano, denotando o papel do

PAR2 nessa importante função celular. Dessa forma, concluímos que o tratamento periodontal, o qual resulta na diminuição dos níveis de proteases e mediadores pró-inflamatórios, está associado com uma diminuição da expressão do PAR2, portanto, sugerindo que a expressão de PAR2 é influenciada pela presença da infecção periodontal, e não uma característica constitutiva favorecendo a inflamação periodontal.

Palavras-chave: Doença periodontal. Inflamação. Receptor ativado por protease do tipo 2. Tratamento não-cirúrgico periodontal.

ABSTRACT

Alves VTE. Evaluation of the protease activated receptor 2 (PAR2) expression in chronic periodontitis patients, before and after non-surgical periodontal treatment [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Protease-activated receptor-2 (PAR2) is implicated in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases including periodontitis; it can be activated by gingipain, produced by *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), and by neutrophil-protease 3 (P3). PAR2 activation plays a relevant role in inflammatory processes by inducing the release of important inflammatory mediators associated with periodontal breakdown. In the present study, the effect of non-surgical periodontal treatment on PAR2 expression and its association with levels of pro-inflammatory mediators, and activating proteases were investigated in chronic periodontitis patients. Moreover it was evaluated *in vitro* the role of MAPK-p38 signaling pathway during PAR2 activation and its influence on superoxide production and phagocytosis capacity in peripheral human neutrophils infected with *P. gingivalis*. A significant mRNA and protein over-expression of PAR2 ($P < 0.05$) in gingival crevicular fluid cells was positively associated to inflammatory clinical parameters, and to the levels of interleukin (IL)-6, IL-8, tumor necrosis factor-alpha, matrix metalloproteases (MMP)-2, MMP-8, hepatocyte growth factor, and vascular endothelial growth factor (evaluated by Bioplex). Elevated levels of gingipain and P3 ($P < 0.05$), and decreased levels of dentilisin mRNA, and protease inhibitors, secretory leucocyte protease inhibitor and elafina ($P < 0.05$) (evaluated by ELISA), were also associated to PAR2 overexpression. Periodontally healthy sites from chronic periodontitis individuals showed a diminished expression of PAR2 mRNA and PAR2 protein level ($P < 0.05$). Furthermore, periodontal treatment resulted in decreased PAR2 expression ($P < 0.05$), correlated with decreased expression of inflammatory mediators ($P < 0.05$) and activating proteases ($P < 0.05$). Moreover, PAR2 antagonist reduced significantly superoxide production in human neutrophils ($P < 0.05$) showing the role of PAR2 on this important cellular function. We concluded that periodontal treatment resulted on decreased levels of proteases, and pro-inflammatory mediators is associated to decreased PAR2 expression, therefore suggesting that PAR2 expression is

influenced by the presence of periodontal infection, and not a constitutive characteristic favoring periodontal inflammation.

Keywords: Periodontal diseases. Inflammation. Protease activated receptor-2. Non-surgical periodontal treatment.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1- (A) Representa o receptor em sua forma “inativa”, aguardando a clivagem do domínio N-terminal no sítio específico (caixa verde). A sequência ligante N-terminal (caixa verde), a qual é exposta após a clivagem enzimática específica, liga-se ao sítio de ativação do próprio receptor (caixa rosa) iniciando sinalização celular (B)27
- Figura 4.1- Cronograma de execução.....39
- Figura 5.1 - Expressão do RNAm do PAR2 no FG dos grupos controle, periodontite crônica (PC) antes e depois do tratamento periodontal não-cirúrgico (PCT), e sítios saudáveis do grupo periodontite crônica (PC) (A). Análise da expressão proteica do PAR2 nos grupos controle, PC, PCT e sítios saudáveis do grupo PC (B). Ao topo da figura B, quantificação densitométrica do *western blot* de todos os grupos representados no gráfico correspondente. Dados expressos em média $\pm$ DP; *P < 0,05 comparados aos valores do grupo controle; † P < 0,05 comparados aos valores do grupo PC53
- Figura 5.2 - Gráfico de dispersão representando a correlação positiva entre a média do RNAm e a média da expressão proteica do PAR2 ($r = 0.8935$).....54
- Figura 5.3 - Expressão do PAR2 em células epiteliais presentes no FG em pacientes controle e PC. Dados expressos em média $\pm$ DP; *P < 0,05 comparados aos valores do grupo controle55
- Figura 5.4 - Dados representativos ilustrando as estratégias de aquisição celular para análise por citometria de fluxo. Células do FG sem marcação foram usadas para determinar o controle negativo (I). Total de leucócitos (PAR2 x CD45) e células epiteliais (PAR2 x Cyt19) na mesma amostra (II). Expressão de PAR2 em leucócitos (painel da esquerda) e células epiteliais (painel da direita) (III)55
- Figura 5.5 - Esquema representativo dos dados de citometria de fluxo para avaliação das células que expressam PAR2 (leucócitos e células epiteliais), em FG de pacientes do grupo PC (A, B, C e D) e C (E, F, G e H). População celular (Controle Negativo) de pacientes do grupo PC sem a presença de anticorpos específicos para marcação das células alvo (A e C). Representação de leucócitos que não expressam PAR2 (Q1) e leucócitos que expressam PAR2 (Q2) no grupo PC (B). Células epiteliais que não expressam PAR2 (Q1) e células epiteliais que expressam PAR2 (Q2) no grupo PC (D). População celular (Controle Negativo) de pacientes do grupo Controle sem a presença de anticorpos específicos para marcação das células alvo (E e G). Leucócitos que não expressam PAR2 (Q1) e leucócitos que expressam PAR2 (Q2) no grupo de Controle (F). Células epiteliais que não expressam PAR2 (Q1) e células epiteliais que expressam PAR2 (Q2) no grupo Controle (H)56

- Figura 5.6 - Expressão do RNAm da gingipaína no grupo controle e no grupo periodontite antes (PC) e depois do tratamento periodontal não cirúrgico (PCT), e sítios saudáveis do grupo PC (A). Expressão do RNAm da dentilisina (B) e P3 (C) no grupo periodontite antes (PC) e seis semanas após o tratamento periodontal não-cirúrgico (PCT). Dados expressos em média $\pm$ DP; *P < 0,05 comparados aos valores do grupo controle; † P < 0,05 comparados aos valores do grupo PC57
- Figura 5.7 - Níveis de SLPI (A) e elafina (B) no FG de pacientes do grupo controle e pacientes do grupo periodontite antes (PC) e depois do tratamento periodontal não-cirúrgico (PCT). Dados expressos em média $\pm$ DP; n = 8 por grupo; *P < 0,05 comparados aos valores do grupo controle58
- Figura 5.8 -Níveis de IL-6 (A), IL-8 (B), TNF- α (C), MMP-1 (D), MMP-2 (E), MMP-8 (F), HGF (G), e VEGF (H) do FG de pacientes dos grupos controle, periodontite antes e após o tratamento periodontal não-cirúrgico. Dados expressos em media $\pm$ DP; n = 8 por grupo; *P < 0,05 comparados aos valores do grupo controle. † P < 0,05 comparados aos valores do grupo PC.....60
- Figura 5.9- Expressão proteica da MAPK-p38 total (A) e fosforilada (B) após infecção dos neutrófilos pela *P. gingivalis* A7436. Ao topo da figura A e B, quantificação densitométrica do *western blot* dos grupos representados nos gráficos correspondentes. Dados expressos em média $\pm$ DP; n = 4 por grupo; *P < 0,05 comparados aos valores do grupo controle (PMN).....62
- Figura 5.10-Expressão proteica da MAPK-p38 fosforilada após infecção dos neutrófilos pela *P. gingivalis* A7436 tratados previamente com tripsina (PMN + Tripsina) e o antagonista do PAR2 (FSLLRY). Ao topo da figura, quantificação densitométrica do *western blot* dos grupos representados no gráfico correspondente. Dados expressos em média $\pm$ DP; n = 4 por grupo; **P < 0,05 comparados aos valores do grupo controle (PMN)....62
- Figura 5.11-Produção de superóxido (O₂⁻) por neutrófilos (A) e células HL-60 (B) previamente tratados com Tripsina e o antagonista PAR2 (FSLLRY), estimulados por fMLP (+), comparados aos grupos não estimulados por fMLP (-).Dados expressos em média $\pm$ DP; n = 6; *P < 0,05 comparados aos valores dos grupos PBS, Tripsina e FSLLRY + fMLP63
- Figura 5.12-Comparação da capacidade de total de fagocitose (%) de neutrófilos tratados (+) ou não (-) com o antagonista do PAR2 (FSLLRY) e infectados pela *P. gingivalis* (A7436) (P > 0,05) (A). Os intervalos P2 à P6 na figura B mostram a eficiência da fagocitose (%) pelo neutrófilo em relação a *P. gingivalis* (A7436) entre os grupos tratados (+) ou não (-) com o antagonista do PAR2 (P > 0,05). Dados expressos em média $\pm$ DP; n = 665

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Sequencia de oligonucleotídeos usados para amplificação do cDNA.	41
Tabela 4.2 - Anticorpos primários, secundários e diluições utilizadas para avaliação da expressão do PAR2 em células do FG	43
Tabela 4.3 - Anticorpos primários, secundários e diluições utilizadas para avaliação da expressão da MAPK-p38 em neutrófilos humanos.	47
Tabela 5.1 - Dados demográficos e características clínicas dos pacientes do grupo controle e grupo periodontite crônica moderada no início e seis semanas após o tratamento periodontal não-cirúrgico.....	51
Tabela 5.2 - Parâmetros clínicos e volume (V) do FG dos sítios periodontais do grupo controle e grupo PC no início e seis semanas após o tratamento periodontal	52
Tabela 5.3 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre o RNAm do PAR2 e PD, NIC, expressão proteica do PAR2, mRNA da gingipaína, SLPI, IL-6, IL-8, TNF- α , MMP-1, HGF e VEGF.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Delta Ct$	Cálculo “ <i>Cycle Threshold</i> ”
AU	Unidades arbitrárias
μg	Microgramas
μl	Microlitros
μM	Micromolar
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina Sérica Bovina
C	Grupo Controle
Ca^{2+}	Cálcio
CD45	Anticorpo para Leucócitos
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cyt 19	Anticorpo para Células Epiteliais
DAP	Ácido diaminopimélico
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Mistura de Trifosfato de Desoxinucleotídeos
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FG	Fluído Gengival
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FSLLRY	Sequência de aminoácido PAR2 antagonista
FXa	Fator Xa
g	Gravidade
h	Hora
H ₂ O	Água
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
HIV	Vírus da Imunodeficiência da Humana
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular do Tipo 1
IG	Índice Gengival

IL-1	Interleucina do Tipo 1
IL-6	Interleucina do Tipo 6
IL-8	Interleucina do Tipo 8
IP	Índice de Placa
KDa	Kilodalton
L	Litros
LPS	Lipopolissacarídeos
MAMP	Microbe-associated molecular patterns
MAPK	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
mM	Milimolar
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MMP-1	Metaloproteinase de Matriz do Tipo 1
MMP-2	Metaloproteinase de Matriz do Tipo 2
MMP-8	Metaloproteinase de Matriz do Tipo 8
n	Número de Participantes
NaCl	Cloreto de sódio
NFKb	Fator nuclear kappa B
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônio
NIC	Nível de inserção clínica
nm	Nanômetros
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PAR	Receptor Ativado por Protease
PAR-1	Receptor Ativado por Protease do Tipo 1
PAR-2	Receptor Ativado por Protease do Tipo 2
PAR-3	Receptor Ativado por Protease do Tipo 3
PAR-4	Receptor Ativado por Protease do Tipo 4
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Grupo Periodontite Crônica
PCT	Grupo Periodontite Crônica após Tratamento Periodontal
PGE ₂	Prostaglandina do Tipo E2
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMN	Polimorfonucleares

PMSF	Fenilsulfonil fluoreto
PRR	Padrão de reconhecimento de patógeno (<i>Pattern recognition receptors</i>)
PS	Profundidade de Sondagem
qPCR	Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real
Rgp	Cisteino-protease gingipaína
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
RNA _t	Ácido Ribonucleico total
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SLIGKV	Sequência de aminoácidos PAR2 agonista (humanos)
SLIGRL	Sequência de aminoácidos PAR2 agonista (camundongo)
SLPI	Inibidores de protease secretados por leucócitos
SS	Sangramento a Sondagem
TBS-t	Tampão salino de Tris com <i>Tween</i> 20
TCG	Isotiocinato de Guanidina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral do Tipo α
TRIS-HCl	Hidroximetil aminometano + Ácido clorídrico
VCAM-1	Molécula-1 de Adesão Celular Vascular
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE SIMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
=	igual
>	maior
±	mais ou menos
° C	graus Celsius
V	Voltz
x	vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Periodontite e resposta imunológica	23
2.2 Receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR2)	26
2.3 PAR2 e inflamação	28
2.4 O papel do PAR2 na doença periodontal	30
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Modelo de estudo e seleção de pacientes	35
4.2 Avaliação clínica	36
4.3 Coleta do fluido gengival	37
4.4 Avaliação da expressão do RNAm do PAR2, gingipaína, dentilisina, e P3	39
4.5 Expressão proteica do PAR2	42
4.6 Avaliação da expressão do PAR2 por leucócitos e células epiteliais do fluido gengival	44
4.7 Avaliação de inibidores de proteases e biomarcadores inflamatórios no fluido gengival	45
4.8 Isolamento de neutrófilos periféricos do sangue	46
4.9 Avaliação do papel da ativação do PAR2 sobre a expressão da via de sinalização intracelular MAPK-p38 em neutrófilos humanos	46
4.10 Produção de superóxido por neutrófilos humanos e células HL-60	48
4.11 Fagocitose dos neutrófilos em citometria de fluxo	49
4.12 Análise Estatística	49
5 RESULTADOS	51
5.1 Características dos pacientes	51
5.2 A expressão do PAR2 em células do fluido gengival é reduzida após o tratamento periodontal	52
5.3 Leucócitos e células epiteliais do fluido gengival expressam o PAR2	54
5.4 A expressão do PAR2 em células do FG está associada com a presença de seus potenciais ativadores presentes na bolsa periodontal	56
5.5 A expressão do PAR2 esta associada ao aumento dos níveis de biomarcadores inflamatórios no fluido gengival	59
5.6 Infecção por <i>P. gingivalis</i> ativa MAPK- p38 independente do PAR2	61

5.7 PAR2 influencia a produção de superóxido em PMNs e células HL-60	63
5.8 PAR2 não influencia na capacidade de fagocitose de neutrófilos	64
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecciosa crônica que afeta o tecido de suporte dos dentes e exibe uma grande variedade de manifestações clínicas, microbiológicas e imunológicas. Essa doença é associada, e provavelmente causada, por uma interação dinâmica multifacetada entre agentes infecciosos específicos, a resposta imunológica do hospedeiro, a exposição ambiental nociva e fatores de susceptibilidade genética (Slots, 2013), podendo prevalecer entre 5 a 15% da população adulta mundial (Dye, 2012).

A presença do biofilme é apenas o início de uma sequência de eventos disparados por fatores de virulência de microrganismos específicos. As proteases, um dos mecanismos de virulência bacteriana, podem causar danos diretos nos tecidos periodontais ou indiretamente, através da interação com receptores de células do hospedeiro, proporcionando o colapso da homeostase e aumentando a capacidade de invasão bacteriana (Sakai, 1985). Dessa forma, a destruição periodontal é o resultado principalmente do desequilíbrio na disponibilidade de fatores pró-inflamatórios, liberados por células hospedeiras que reconhecem moléculas específicas de agentes patogênicos.

O receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR2) é um receptor com sete domínios transmembrânicos o qual pertence a uma família de receptores acoplados à proteína G. A sua ativação por proteases bacterianas tem sido associada a eventos pró-inflamatórios em diferentes células (Dulon et al., 2005; Boitano et al., 2011; Kajikawa et al., 2007). A associação do PAR2 com a doença periodontal foi indiretamente sugerida por estudos os quais demonstraram que o PAR2 poderia ser expresso por células presentes no periodonto, e que a sua ativação pela protease gingipaína produzida pela *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), o principal agente etiológico relacionado à periodontite crônica poderia ser, em parte, responsável pela liberação de mediadores pró-inflamatórios envolvidos na doença periodontal (Lourbakos et al., 1998; Abraham et al., 2000; Uehara et al., 2008).

A relação entre PAR2, gingipaína e periodontite foi demonstrada pela primeira vez em um estudo em ratos (Holzhausen et al., 2005a) seguido por outro

estudo *in vivo* o qual demonstrou que a ativação do PAR2 durante a infecção pela *P. gingivalis* resulta em perda óssea alveolar em camundongos (Holzhausen et al., 2006). Ainda, em estudo recente, Holzhausen et al., (2010) demonstraram o envolvimento do PAR2 na doença periodontal em humanos representada pelo aumento da expressão de PAR2 em células do fluido gengival (FG) associado ao aumento da atividade proteolítica do tipo tripsina, aumento dos níveis de proteinase-3 (P3) e dos níveis de mediadores pró-inflamatórios interleucina-6 (IL-6), IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Além disso, sítios periodontais com a presença de *P. gingivalis* foram associados positivamente com uma maior atividade proteolítica e com uma maior expressão de PAR2 (Fagundes et al., 2011).

Dessa forma, os estudos presentes na literatura demonstram que o PAR2 está envolvido na patogênese da doença periodontal. No entanto, não é possível saber se a expressão do PAR2 é devida à presença da inflamação periodontal, ou se é uma característica constitutiva do indivíduo, a qual predispõe à inflamação.

A hipótese do presente estudo foi de que a expressão do PAR2 está relacionada com a presença de inflamação nos tecidos periodontais, dessa forma, a terapia periodontal não-cirúrgica da periodontite crônica em humanos levaria à diminuição da expressão do PAR2 em células do fluido gengival. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo investigar a expressão do PAR2 em células do fluido gengival, antes e depois do tratamento periodontal não-cirúrgico, bem como avaliar sua correlação com a expressão de ativadores endógenos e bacterianos do PAR2 presentes na bolsa periodontal. Além disso, este estudo se propôs a avaliar também os tipos celulares os quais poderiam expressar o PAR2 no fluido gengival em pacientes com periodontite crônica.

Ainda, uma vez que o PAR2 é expresso por neutrófilos (PMNs), células-chave na proteção dos tecidos periodontais (Schenkein, 2006) e cuja ativação está associada com processos inflamatórios (Shpacovitch et al., 2007a), este estudo se propôs a avaliar se a ativação do PAR2 em neutrófilos humanos pela gingipaína da *P. gingivalis* poderia estar relacionada ao aumento da expressão da MAPK-p38, uma das mais importantes vias de sinalização relacionada à inflamação, e também com a regulação da produção de superóxido e a capacidade de fagocitose por esses polimorfonucleares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Ao longo das últimas décadas, o estudo sobre a patogênese da doença periodontal tem sido um dos temas mais intrigantes da odontologia e ainda hoje, a moderna biologia molecular e o uso de sofisticadas técnicas de investigação não são ferramentas suficientes para explicar inúmeras questões relacionadas a esta e outras doenças. A busca incessante do entendimento entre as complexas relações entre microrganismo e hospedeiro tem gerado uma vasta literatura de forma a encurtar a distância até o mais abrangente conhecimento o qual irá permitir o domínio ou a cura dessa doença.

2.1 Periodontite e resposta imunológica

O termo doença periodontal no seu mais estrito sentido refere-se à gengivite e à periodontite. A gengivite é uma condição inflamatória da gengiva marginal em resposta direta ao biofilme dental. A periodontite pode suceder a gengivite, sendo também influenciada pela resposta imunológica de cada indivíduo. A presença do biofilme, contendo bactérias gram-negativas, é condição essencial para o início e progressão dessa doença, a qual envolve a destruição das estruturas de suporte que circundam o dente incluindo o ligamento periodontal, osso e tecidos moles (Kinane, 2001).

O modelo proposto por Page e Kornman (1997) é uma das referências de patogênese da doença periodontal mais tradicionais, a qual sugere que a placa bacteriana aciona uma resposta inflamatória que leva à destruição das estruturas periodontais em hospedeiros susceptíveis, com adicional influência do meio ambiente, fatores genéticos e de risco. Ao longo de décadas de investigação, duas linhas de raciocínio e de sentidos opostos embasam a etiopatogenia dessa doença, a primeira evidencia a bactéria patogênica e seus produtos como causa primária (Teles et al., 2013) enquanto que a segunda linha infere que a presença da bactéria é um evento secundário dirigido pela inflamação descontrolada e a resposta

imunológica do hospedeiro (Van Dyke, 2008; Bartold; Van Dyke, 2013). Apesar de rica e controversa a literatura é ímpar ao afirmar que a bactéria é causa necessária e não suficiente para produzir periodontite (Page; Kornman, 1997). Independente da direção da patogênese a doença periodontal ocorre, sob certo aspecto, porque bactéria e hospedeiro identificam-se e interagem por meio de mecanismos extremamente específicos, e esse reconhecimento, de acordo com Janeway (1989) é crítico, ao direcionar, seletivamente, a resposta imunológica aos agentes infecciosos.

Células do hospedeiro são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos ou, mais recentemente, micróbios (por não estarem somente associados à microbiota patogênica) (PAMPs ou MAMPs - do inglês *pathogen/microbe-associated molecular patterns*) (Mackey; McFall, 2006), por meio de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR - do inglês *pattern recognition receptors*), presentes tanto na membrana celular quanto no citoplasma. A sinalização via PRR tem um papel fundamental na ativação e recrutamento das células da resposta imunológica, como monócitos e neutrófilos. A característica infecciosa crônica da periodontite provoca ainda a participação de células da resposta imune adaptativa como linfócitos para o local da infecção (Berglundh et al., 2007). De modo interessante, os MAMPs oriundos da microbiota comensal não ativam a resposta inflamatória podendo contribuir positivamente, por meio dos PRRs, para as funções imunológicas (Kubinak; Round, 2012).

Numerosos fatores de virulência de bactérias periodontais (Tanner; Izard, 2006, Holt et al., 1999; Ishihara, 2010) são responsáveis por ativar a resposta imune inata através do seu reconhecimento por receptores citosólicos do tipo NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) e os receptores transmembrânicos do tipo TOLL e PAR (Receptor Ativado por Protease). Essa interação entre bactérias e seus produtos e receptores celulares resulta quase sempre na ativação de uma cascata de sinalização a qual leva a produção de fatores de transcrição e consequentemente indução da liberação de potentes mediadores pro-inflamatórios (Darveau, 2009).

Por estarem presentes em células do epitélio da cavidade oral e bolsa periodontal (Sugawara et al., 2006) os receptores citosólicos NOD1 e NOD2 vem

sendo estudados como importantes PRRs e por induzirem a resposta imune inata. NOD1 reconhece gama-D-glutamil-meso-DAP, que é preferencialmente encontrado em bactérias Gram-negativas (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003a), enquanto que NOD2 reconhece dipeptídeo de muramilo, encontrado no peptideoglicano de praticamente todas as bactérias (Girardin et al., 2003b). NOD1 e NOD2 estão envolvidos no reconhecimento de bactérias infecciosas, na indução das respostas imunológicas, bem como na eliminação de bactérias através da ativação da via de sinalização NF- κ B (Viala et al., 2004; Kim et al., 2008).

A descoberta dos receptores do tipo TOLL, em 1985, foi de grande importância uma vez que, posteriormente, esses receptores foram identificados como ativadores da resposta inflamatória frente à invasão microbiana. Dez receptores dessa família foram reconhecidos em células humanas, sendo predominantemente expressos em células do sistema imune inato. Diferentes células do periodonto expressam ao menos dois tipos de receptores do tipo TOLL (Hans; Hans, 2011). E de modo interessante um mesmo periodontopatógeno, através de diferentes e específicos fatores de virulência, pode ativar mais de um receptor. Essa heterogeneidade celular, bem como a habilidade de alguns patógenos como, por exemplo, a *P. gingivalis* em interagir ao mesmo tempo com TLR2, TLR4 e TLR9 (Wara-aswapati et al., 2013; Sun et al., 2010) além de outros receptores (Liu et al., 2013), pode explicar em parte a especificidade da resposta imunológica e ao mesmo tempo dificultar o seu entendimento (Mahanonda; Pichyangkul, 2007).

A *P. gingivalis* é uma bactéria anaeróbia gram-negativa que está fortemente associada com a periodontite. Ao dispor de uma variedade de fatores de virulência, tais como lipopolissacarídeo (LPS), fímbrias, e cisteíno-proteases conhecidas como gingipaínas, a *P. gingivalis* manipula a imunidade inata do hospedeiro na tentativa de promover o seu desempenho adaptativo (Bostanci; Belibasakis, 2012). Um estudo de Uehara et al. (2008) demonstrou que as cisteíno-proteases da *P. gingivalis*, gingipaínas Rgps e Kgp, aumentam sinergicamente a secreção de citocinas pró-inflamatórias de células monocíticas humanas através dos receptores do tipo PAR1, PAR2 e PAR3 em associação com os receptores TOLL ou NOD, sugerindo uma inter-relação entre bactéria e o sistema de defesa. Interessantemente, (Lourbakos et al., 1998, 2001; Holzhausen et al., 2006) já

havia demonstrado que a gingipaína poderia atuar como molécula sinalizadora por meio da ativação direta do receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR2).

2.2 Receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR2)

Os receptores ativados por protease (PARs) são uma família de receptores que possuem sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G (Lourbakos et al., 2001), sendo providos de um mecanismo único de ativação que permite que os mesmos atuem como sensores celulares da atividade proteolítica. Até o presente momento, quatro membros dessa família foram identificados: PAR1, PAR2, PAR3 e PAR4, os quais podem ser ativados por proteases produzidas por microrganismos bem como proteases oriundas de células da resposta imunológica. Dessa forma, os PARs podem ser vistos como componentes do sistema de alarme do hospedeiro frente à resposta antimicrobiana (Shpacovitch et al., 2007b). PAR1, PAR3 e PAR4 são ativados principalmente pela trombina. PAR1 pode ainda ser ativado pelo fator de coagulação FXa e catepsina G, enquanto PAR4 além da catepsina G também pode ser ativado pela tripsina. Essa variabilidade bem como intensidade de ativação oscila de tecido para tecido, sendo fisiologicamente relevante para atividade funcional dos receptores bem como a especificidade da resposta (Schmidlin; Bunnet, 2001).

A expressão do receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR2) foi observada pela primeira vez em ovócitos de sapos (*Xenopus laevis oocytes*) por Nystedt et al. em 1994. Nesse estudo, o PAR2 foi ativado por baixas concentrações de tripsina e por um peptídeo sintético específico criado a partir da mesma sequência peptídica do receptor (SLIGRL), não sendo sensibilizado pela trombina a qual ativa PAR1, PAR3 e PAR4.

Hoje sabemos que o PAR2, além da tripsina pancreática e extra pancreática (endoteliais e epiteliais), também pode ser ativado pela triptase do mastócito, P3 do neutrófilo, fatores de coagulação (VIIa/Xa), serino-protease-1 da membrana, ou pela protease bacteriana gingipaína, produzida pelo periodontopatógeno *P. gingivalis* (Lourbakos et al., 2001; Vergnolle et al., 2001). Os peptídeos agonistas do PAR2 o

ativam de maneira irreversível por proteólise, através da clivagem do receptor no domínio N-terminal, expondo a terminação de aminoácidos SLIGKV, em humanos, ou SLIGRL em animais. Essa sequência se liga ao próprio receptor, iniciando a sinalização intracelular (Ossovsckaya; Bunnett, 2004) (figura 2.1) através da ativação da proteína G acoplada ao receptor, e consequente aumento do Ca^{2+} intra-celular (Bohm et al., 1996).

Figura 2.1 – (A) - Representa o receptor em sua forma “inativa”, aguardando a clivagem do domínio N-terminal no sítio específico (caixa verde). A sequência ligante N-terminal (caixa verde), a qual é exposta após a clivagem enzimática específica, liga-se ao sítio de ativação do próprio receptor (caixa rosa) iniciando sinalização celular (B)

Ao mesmo tempo em que ocorre a ativação da proteína G, a beta-arrestina é recrutada, e promove a internalização e direcionamento do PAR2 ao lisossomo, onde o receptor será degradado (Ossovsckaya; Bunnett, 2004). Acontece então a síntese de novos receptores PAR2 pelo Complexo de Golgi e a ressensibilização pela disponibilização dos mesmos na superfície celular (Bohm et al., 1996).

A beta-arrestina é uma proteína citosólica a qual interage com a proteína G ativada. Na maioria dos casos a formação do complexo beta-arrestina-PAR2, além de mediar a internalização receptor, leva a sinalização da via Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK), incluindo as vias inflamatórias mais responsivas ERK1/2, p38 e JNK (Kanke et al., 2001), principalmente expressas em neutrófilos, macrófagos e células tumorais (DeFea et al., 2000).

A MAPK-p38 é a via que tem recebido mais atenção devido a sua capacidade de regular a nível transcricional e pós-transcricional a produção de citocinas e prostanóides pró-inflamatórios (Souza et al., 2010; Li et al., 2012), tais como o TNF-

α , IL-6 e prostaglandina E_2 (PGE_2), os quais causam direta ou indiretamente a perda óssea podendo levar também a ativação de MMPs (Page, 1991; Kirkwood et al., 2009). Estudos prévios mostraram a ativação da via MAPK-p38 em vários tipos de células humanas estimuladas com *P. gingivalis* (Liu et al., 2012). Num estudo em células endoteliais conduzido por Walter et al. (2004) demonstrou-se que a *P. gingivalis* induz à fosforilação da MAPK-p38, com subsequente aumento da expressão de E-selectina e ICAM-1. No entanto, o possível envolvimento da via de sinalização MAPK na inflamação periodontal associada à ativação do PAR2, ainda merece maiores esclarecimentos.

Ainda o estímulo da proteína G, via PAR2 leva a fosforilação de $IKK\alpha$ e $IKK\beta$, levando a ativação do fator nuclear kappa B (NFkB) (Kanke et al., 2001). A ativação dessas vias de sinalização pelo PAR2 resulta direta ou indiretamente na liberação de mediadores pro-inflamatórios tais como TNF- α , IL-8, IL-6 os quais são tidos como os maiores mediadores da progressão da doença periodontal.

Além disso, a ativação do PAR2 induz a formação de ácido araquidônico e a liberação de seus metabolitos incluindo a PGE_2 envolvendo a fosfolipase A2 e as cicloxigenases 1 e 2 (Syeda et al., 2006).

2.3 PAR2 e inflamação

O receptor PAR2 é encontrado em tecidos provenientes de diferentes áreas do corpo humano, possivelmente participando do processo inflamatório *in vivo*, regulando as respostas do hospedeiro frente à injúria tecidual (Vergnolle, 1999; Cocks; Moffatt, 2000; Loubakos et al., 2001; Vergnolle et al., 2001; Coughlin; Camerer, 2003). Por isso, o envolvimento do receptor PAR2 na reação inflamatória tem sido sugerido por diversos estudos (Holzhausen et al., 2005b).

A inflamação é acompanhada por alterações na permeabilidade dos vasos sanguíneos em favor às proteínas plasmáticas e células. Muitos sinais inflamatórios acionam *gaps* entre as células endoteliais e vênulas pós-capilares, resultando no extravasamento do plasma e edema, por sua vez esse estímulo também pode

induzir a expressão de moléculas de adesão e o infiltrado de granulócitos no interior dos tecidos (Ossovskaia; Bunnett, 2004).

A ativação do PAR2 induz o edema e infiltrado granulocítico (Vergnolle et al., 1999a) além de estimular o rolamento, adesão e extravasamento de leucócitos *in vivo* (Vergnolle, 1999b). Além disso, a ativação do PAR2 está associada ao relaxamento dos vasos sanguíneos, hipotensão, aumento da permeabilidade vascular, marginação leucocitária e dor (Cocks; Moffatt, 2000; Coughlin; Camerer, 2003; Vergnolle et al., 2001).

O papel pró-inflamatório do PAR2 e proteinases agonistas na colite e enterite tem sido descrito em modelos animais (Hansen, 2005; Cottrell et al., 2007), e também em estudos clínicos os quais sugerem que o PAR2 pode estar envolvido na patogênese da inflamação intestinal, particularmente na colite ulcerativa (Kim, 2003; Yoshida; Yoshikawa, 2006). Há evidência de que a administração de agonistas do PAR2 (peptídeo sintético ativador do PAR2, tripsina, triptase) leva a uma reação inflamatória caracterizada por edema, infiltração granulocítica, aumento da permeabilidade intestinal e liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF- α) (Cenac et al., 2004). Ainda o envolvimento do PAR2 na inflamação esofágica tem sido sugerido por estudos em animais (Naito et al., 2006) e em células esofágicas de linhagem humana (Yoshida et al., 2007).

Nas vias aéreas, a deleção do gene do PAR2 leva à diminuição do processo inflamatório (Schimidlin et al., 2002), bem como a sua ativação induz a migração de células leucocitárias e produção de PGE₂ (Nichols et al., 2012). Nas articulações a deleção do PAR2 além de reduzir o processo inflamatório (Ferrell et al., 2003) foi responsável por atrasar o início da inflamação (Lindner et al., 2000).

Alguns estudos sugerem ainda uma importante associação do PAR2 com a dor de origem inflamatória. O receptor PAR2 foi identificado nos nervos sensoriais aferentes onde tem sido associado à hiperalgesia térmica e mecânica (Vergnolle et al., 2001, Coelho et al., 2002, Cenac et al., 2007).

Levados em conjunto, estes achados sugerem que o PAR2 possui um papel crucial na regulação da inflamação.

2.4 O papel do PAR2 na doença periodontal

A associação do PAR2 com a doença periodontal foi indiretamente sugerida por alguns estudos que demonstraram que células presentes nos tecidos periodontais, incluindo neutrófilos, células do epitélio oral e fibroblastos gengivais humanos expressavam o PAR2 (Lourbakos et al., 2001; Abraham et al., 2000).

Lourbakos et al., 2001 demonstraram que em uma linhagem de células epiteliais orais, a ativação do PAR2 pela gingipaína induziu a secreção da citocina pro-inflamatória IL-6, a qual é um importante estimulador da diferenciação de osteoclastos e da reabsorção óssea. Moriyuki et al., 2008, observaram que o peptídeo sintético agonista específico do PAR2 (SLIGRL) estimula a produção de a produção de IL-8, a qual é capaz de estimular a atividade de metaloproteinases da matriz (MMPs), as principais responsáveis pela destruição do colágeno nas lesões periodontais. Em concordância com esses estudos *in vitro*, Holzhausen et al, 2005a demonstraram que a administração do agonista seletivo do PAR2 (SLIGRL) causa periodontite em ratos através de um mecanismo envolvendo liberação de prostaglandinas e ativação de MMP. Ainda, em um estudo *in vivo* subsequente, Holzhausen et al., 2006 observaram que a ativação do PAR2 após inoculação de *P. gingivalis* leva à inflamação em camundongos. Análises dos fluídos coletados de câmaras dorsais demonstraram que animais PAR2-knockout (PAR2^{-/-}) infectados com *P. gingivalis* apresentam uma resposta inflamatória diminuída com relação aos animais PAR2^{+/+}. Neste estudo, concluiu-se que na presença de *P. gingivalis*, o receptor PAR2 regula os mecanismos celulares do hospedeiro responsáveis pelo aumento dos níveis de células inflamatórias e de mediadores pró-inflamatórios, tais como, PGE₂, interferon- γ , IL-1 β , e IL-6. Além disso, esse estudo demonstrou que o PAR2 possui um papel importante na perda óssea alveolar em modelo de periodontite experimental por *P. gingivalis* em camundongos.

O periodonto inflamado é caracterizado por um constante infiltrado de neutrófilos, os quais migram dos vasos sanguíneos gengivais para o sulco gengival/bolsa periodontal onde placa subgengival e fluido gengival estão presentes. Níveis elevados de atividade proteolítica foram identificados no fluído gengival de pacientes com doença periodontal, onde uma mistura de proteases endógenas

(serino-proteinase 3 do neutrófilo, MMPs) e exógenas (proteases bacterianas) combinam-se para mediar a degradação do tecido conjuntivo (Reynolds; Meikle, 1997). Dentre as enzimas proteolíticas identificadas no ambiente periodontal, as quais podem ativar o PAR2, destacam-se a P3 liberada por neutrófilos ativos, a triptase do mastócito, e a cisteína-protease gingipaína (Nickel et al., 2006; Uehara et al., 2005, 2007). Dessa forma, a possível ativação do PAR2 por proteases presentes no fluido, principalmente a serino-proteinases 3 do neutrófilo, poderia resultar em um maior acúmulo de neutrófilos e células imunes em sítios periodontais.

Para manter a homeostase tecidual, proteases do neutrófilo, como a P3 e a elastase são reguladas por inibidores de protease, incluindo a SLPI e a elafina, as quais são consideradas os principais inibidores de protease presentes na gengiva (Williams et al., 2006). De modo interessante, foi demonstrado que a *P. gingivalis* pode tanto induzir SLPI e elafina quanto degradar esses inibidores (Yin et al., 2010). Ainda as gingipaínas RgpA e RgpB mostraram eficientemente reduzir a habilidade de SLPI em inibir a elastase (Into et al., 2006) sugerindo que a infecção por *P. gingivalis* pode ter um efeito de duas vias nos níveis de inibidores de proteases na gengiva inflamada. De acordo com Kadulski et al., (2011) a redução de níveis de SLPI poderia ainda regular indiretamente a atividade do PAR2.

De modo interessante, foi demonstrado que a produção do fator de crescimento de hepatócitos (HGF) por fibroblastos gengivais humanos sob estímulo de Rgp ocorreu através de PARs, especificamente PAR1 e PAR2 (Uehara et al., 2005). HGF é uma citocina produzida por fibroblastos gengivais e células do ligamento periodontal sob estímulo de citocinas pro-inflamatórias como a IL-1 e alguns fatores de virulência bacterianos como a gingipaína.

De acordo com os resultados obtidos em estudo anterior (Holzhausen et al., 2010), pode-se concluir que há um aumento significativo da expressão do receptor PAR2 no periodonto de pacientes com periodontite crônica em relação aos pacientes periodontalmente saudáveis (cerca de 2,3 vezes maior). Além disso, mostrou-se que essa expressão aumentada do PAR2 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica está associada com: i) presença de níveis significativamente maiores dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-1 α , IL-6 e IL-8 no fluido gengival; ii) uma maior atividade proteolítica total (atividade tipo tripsina)

no fluido gengival; e com iii) níveis elevados de possíveis ativadores do PAR2. Mais especificamente, um aumento da expressão do PAR2 em pacientes com periodontite crônica está associado com uma expressão significativamente maior de P3 e com uma maior prevalência do periodontopatógeno *P. gingivalis*, produtor de gingipaína.

Ainda, um estudo recente de nosso grupo demonstrou que bolsas periodontais com a presença de *P. gingivalis* apresentam células do fluido gengival com uma elevada regulação do gene do PAR2 em relação aos sítios com ausência do periodontopatógeno (Fagundes et al., 2011).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o efeito da terapia periodontal sobre a expressão do receptor PAR2 em indivíduos com periodontite crônica,

OBJETIVO ESPECÍFICO 1:

O primeiro objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do RNAm e proteica do PAR2 em células do fluído gengival de sítios periodontais de indivíduos saudáveis ou com periodontite crônica, antes e após o tratamento periodontal não-cirúrgico.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2:

Avaliar a expressão de PAR2 em células do fluido gengival de sítios periodontalmente saudáveis de pacientes com periodontite crônica.

OBJETIVO ESPECÍFICO 3:

O terceiro objetivo foi avaliar a associação da expressão do PAR2 com a expressão de gingipaína, dentilisina, P3, SLPI e elafina presentes no fluido gengival.

OBJETIVO ESPECÍFICO 4:

O quarto objetivo foi avaliar os níveis de biomarcadores inflamatórios: IL-6, IL-8, TNF α , MMP1, MMP2 e MMP8, HGF e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), presentes no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica antes e após o tratamento periodontal não-cirúrgico e correlacioná-los com a expressão de PAR2.

OBJETIVO ESPECÍFICO 5:

O quinto objetivo deste estudo foi detectar o(s) tipos celulares(s) que expressam o PAR2 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica.

OBJETIVO ESPECÍFICO 6:

O sexto objetivo foi avaliar *in vitro* a via de sinalização MAPK-p38, seguida à ativação do PAR2 em neutrófilos humanos durante a infecção por *P. gingivalis*.

OBJETIVO ESPECÍFICO 7:

O sétimo objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* a influência do PAR2 na produção de superóxido (O_2^-) por neutrófilos do sangue periférico humano e células HL-60.

OBJETIVO ESPECÍFICO 8:

O oitavo objetivo deste estudo foi avaliar o papel do PAR2 na capacidade de fagocitose de neutrófilos do sangue periférico humano infectados por *P. gingivalis*.

4 MATERIAL E METODOS

4.1 Modelo de estudo e seleção de pacientes

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FR337902, protocolo 106/2010) (Anexo A). A FAPESP foi responsável pela concessão da bolsa de doutorado através do processo nº 2010/20477-8 (Anexo B).

A seleção dos pacientes ocorreu entre julho de 2010 e fevereiro de 2012 na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Os participantes foram informados sobre a natureza do estudo e em seguida assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo C),

Trezentos e quarenta e três indivíduos foram avaliados por meio de anamnese (Anexo D) e exame clínico periodontal. Trinta e quatro indivíduos com periodontite crônica moderada (grupo PC) (Armitage, 1999) e 31 indivíduos periodontalmente saudáveis (grupo C) foram incluídos no estudo com base em critérios de inclusão que determinava a participação de pacientes de ambos os sexos e nunca fumantes (auto-relato). Não puderam participar do estudo indivíduos que apresentassem um ou mais critérios de exclusão que consistiram em uso de aparelho ortodôntico; necessidade de medicação antibiótica prévia ao tratamento dental; uso de antibióticos, fenitoína, antagonistas de cálcio, ciclosporina ou drogas antiinflamatórias nos seis meses prévios a consulta inicial; uso de contraceptivos hormonais ou reposição hormonal, história de diabetes, hepatite ou infecção por HIV ou qualquer outra doença que pudesse comprometer as funções imunológicas; gravidez ou lactação; quimioterapia imunossupressora; tratamento periodontal nos seis meses antecedentes ao início do estudo.

4.2 Avaliação clínica

Os pacientes foram clinicamente avaliados por um periodontista previamente treinado e calibrado (MH). Dez pacientes foram examinados duas vezes para cada um dos parâmetros clínicos avaliados, de onde se obteve a confiabilidade diagnóstica intra-examinador aferida pela estatística de Kappa (0,92).

O estudo foi realizado em dois momentos. Na fase 1 (*baseline*) foi realizado exame clínico periodontal (Anexo E), que consistiu na obtenção dos índice de placa (IP) e índice gengival (IG) (Løe, 1967), medidas de profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento à sondagem (SS) em seis sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual) de cada dente, utilizando-se uma sonda periodontal manual (PCPUNC 15, Hu-Friedy, Chicago, EUA). O sangramento à sondagem foi determinado dicotomicamente pela presença (+) ou ausência (–) de sangramento observado durante 30 segundos após a primeira inserção da sonda na bolsa periodontal. As mensurações obtidas foram descritas em ficha clínica periodontal (Anexo E).

Com base na avaliação periodontal, a população do estudo foi dividida em dois grupos. O grupo controle (C) composto por 31 pacientes sistemicamente e periodontalmente saudáveis, com sangramento a sondagem < 10%, < 1% dos sítios com profundidade de sondagem $\geq$ 5mm, nenhum sítio apresentando profundidade de sondagem $\geq$ 6mm, < 1% dos sítios com perda de inserção clínica $\geq$ 2mm e sem evidência radiográfica de perda óssea alveolar, e o grupo periodontite crônica (PC), representado por 31 pacientes com periodontite crônica com destruição moderada, ou seja, com mais de 30% dos sítios apresentando profundidade de sondagem de 3 a 6 mm, nível de inserção clínica a partir de 4mm e sangramento a sondagem em mais de 30 % do sítios.

Ambos os grupos receberam instrução de higiene oral com escova e fio dental e foram orientados a não utilizar enxaguatórios orais durante o período do estudo. Pacientes com periodontite crônica receberam tratamento periodontal não-cirúrgico que foi realizado entre quatro a seis sessões programadas de acordo com as condições e características individuais de cada paciente. O tratamento periodontal

foi realizado por um único periodontista (VTEA) e consistiu na eliminação de fatores iatrogênicos (restaurações, próteses, se necessário); raspagem, alisamento e polimento corono-radicular com instrumentação manual (Gracey curettes; Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) e ultrassom (Minipiezon; EMS, Switzerland), integração clínica (restauração provisória de cáries, extração de dentes condenados, se necessário) e revisão dos procedimentos básicos.

A fase de pós-tratamento estendeu-se por um período de seis semanas (Segelnick; Weinberg, 2006). Durante esse período os pacientes receberam, semanalmente, reforço das instruções de higiene oral, raspagem supra-gengival e polimento, até a fase da reavaliação.

Na segunda fase do tratamento (seis semanas após o término da fase 1) os pacientes do grupo periodontite (PC) foram reexaminados, com os mesmos parâmetros clínicos inicialmente realizados conforme a avaliação clínica acima descrita e novas amostras para os exames laboratoriais foram coletadas conforme descrição a seguir (figura 4.1).

Durante a fase de tratamento três pacientes do grupo periodontite crônica foram excluídos do estudo pelos seguintes motivos: problemas de saúde e mudança de endereço. Dessa forma dos trinta e quatro pacientes incluídos inicialmente, 31 indivíduos participaram efetivamente do estudo.

4.3 Coleta do fluido gengival

Em pacientes com periodontite crônica o fluido gengival foi coletado em sítios com maiores profundidades de sondagem (entre 4 e 6mm), um sítio por quadrante. Ainda, nesses pacientes, amostras de um sítio periodontal saudável (sem perda de inserção, com ausências de placa bacteriana e sangramento a sondagem) foram coletadas antes do tratamento periodontal e no momento da reavaliação, nos mesmos sítios previamente selecionados. No grupo controle, um sítio periodontal por quadrante foi escolhido para coleta do fluido gengival.

A placa subgengival foi cuidadosamente removida e os sítios periodontais foram isolados com gaze estéril. Duas tiras de papel absorventes (Periopaper Collection Strip; Oraflow, Plainview, NY, EUA) foram introduzidas, na bolsa ou sulco periodontal, e removidas após 30 segundos, uma de cada vez, com intervalo médio de 15 minutos entre cada uma. Duas tiras de papel foram utilizadas para a análise de PCR em tempo real, e outras duas tiras de papel coletadas dos mesmos sítios, em uma consulta posterior, para a análise de *Western-blot*. Para ambas as técnicas os sítios foram analisados separadamente. Uma terceira coleta do fluido gengival, em uma terceira consulta, ocorreu na forma de *pool*, quatro sítios por quadrante, e foi utilizada para a análise dos inibidores de proteases e biomarcadores inflamatórios e cálculo do volume de fluido gengival (Periotron 6000; IDE, Interstate, Amityville, NY, EUA). Amostras de fluído gengival com contaminação de sangue visível foram descartadas. Posteriormente as coletas, as amostras foram mantidas em biofreezer até o momento das análises.

Para a análise dos tipos celulares o fluido gengival foi coletado através da técnica de lavagem intracrevicular (Salonen; Paunio, 1991) imediatamente antes do início do tratamento periodontal, nos mesmos sítios onde foram coletadas as amostras em tiras de papel. A técnica de lavagem intracrevicular foi realizada por intermédio de utilização de uma seringa de injeção de 1mL (Becton, Dickinson and Company, EUA) acoplada a uma microcânula plástica flexível (Tygon[®], Saint-Gobain Performance Plastics, Akron, OH, EUA). A introdução da microcânula foi realizada delicadamente no sítio alvo e a ejeção de 100µL de solução PBS, pH 7,2 (PBS, pH 7,2 Gibco[®], Invitrogen) foi feita por 5 vezes seguidas, totalizando 500µL de solução injetada em cada sítio. Simultaneamente, foi utilizada outra seringa (Becton, Dickinson and Company EUA, 1mL) para a aspiração do lavado o qual foi depositado em tubo do tipo Falcon 15mL (Biolix, EUA) estéril. Após o processo, o material coletado foi acondicionado em gelo picado e levado imediatamente para análise laboratorial.

Figura 4.1 - Cronograma de execução

4.4 Avaliação da expressão do RNAm do PAR2, gingipaína, dentilisina e P3

A expressão do RNAm do receptor PAR2, gingipaína, dentilisina e P3 presente em amostras de fluido gengival foi avaliada 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 300µL de Trizol [isotiocinato de guanidina (TCG) em solução de fenol - Invitrogen Brasil LTDA (1mL/100µL de amostra)]. Após a homogeneização as amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, e então foi adicionado 60µL de clorofórmio, após o qual foram agitadas por inversão durante 15 segundos. As amostras foram incubadas por 2 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugadas a 12000g por 30 minutos a 4°C (Eppendorf, 5417R, EUA). Posteriormente, 200µL da fase superior foram transferidos para um novo microtubo no qual foi adicionado 200µL de isopropanol. Após 15 segundos de agitação vigorosa por inversão, os microtubos foram deixados em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente foram centrifugados a 12000g por 20 minutos, a 4°C, para formação do precipitado de RNA.

Para a lavagem do tRNA, os sobrenadantes foram descartados (vertidos) e o tRNA precipitado (*pellet*) foi lavado com 1mL de etanol 75% (diluído em água

tratada com dietil-piromcarborato (DEPC) 0,01% e inativada em autoclave) e posteriormente centrifugados a 7600g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o excesso de álcool foi removido com o auxílio de uma ponteira. Os tubos foram ainda deixados por 10 minutos a temperatura ambiente para total secagem do *pellet*.

Para a quantificação do tRNA, o *pellet* de tRNA foi ressuspenso em 12µL de água DEPC inativa 0,01%. As leituras foram feitas utilizando-se 1µL da amostra, em duplicata. As absorbâncias foram medidas a 260nm em espectrofotômetro (NanoDrop 2000), sendo as concentrações de tRNA calculadas considerando a relação 1AU = 40µg/mL, conforme a fórmula: [RNA µg/mL] = Abs x 40. Foram consideradas adequadas aquelas razões 260RNA/280PROT entre 1,8 e 2,0.

Os 10µL de tRNA restantes foram aquecidos a 65°C por 5 minutos, seguido por choque térmico em gelo. A este volume foi adicionado 10µL de um mix contendo 1µL de oligodT (0,5µg/ µL - Invitrogen, Brasil); 0,5µL de Random Primer (0,5 µg/µL Promega, Brasil); 1µL da mistura de trifosfato de desoxinucleotídeos (dNTPs), a saber - 10mM de dATP, 10mM de dTTP, 10mM de dCTP e 10mM de dGTP - Invitrogen Brasil; 4µL de tampão de reação (5 x first strand buffer), 2µL de DTT (0,1M), 0,5µL de RNaseOUT (40U/µL) e, por último, 1µL da enzima MMLV (200U/µL).

A mistura foi posteriormente homogeneizada e incubada a 42°C durante 60 minutos em banho-maria, sendo posteriormente incubada a 70°C durante 15 minutos em banho-maria para inativação da enzima. As amostras foram, então, mantidas a - 20°C até serem submetidas à reação em cadeia de polimerase (PCR). A reação em cadeia de polimerase em tempo real (*real time* PCR) foi realizada em um volume final de 20µL contendo 2µL de cDNA (transcrito anteriormente), 1µL do oligonucleotídeo sense (10µM), 1µL do oligonucleotídeo antisense (10µM); 6µL de H₂O DEPC autoclavada e por fim 10µL de GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Brasil).

Os oligonucleotídeos para o PAR2 bem como o desenho dos *primers* foram obtidos do *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). As sequências geradas foram analisadas no *Blast* quanto à especificidade. As sequências dos

oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do cDNA, bem como o número de acesso ao *GeneBank* são apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Sequencia de oligonucleotídeos usados para amplificação do cDNA

GENE	Sequencias <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R)	Acesso ao GenBank	Tamanho do fragmento
PAR2 (F)	5'- TGCTAGCAGCCTCTCTCTCC -3'	NM_005242.4	92pb
PAR2 (R)	5'- TGTGCCATCAACCTTACCAA -3'		
Proteinase 3 (F)	5'- TCTGCTTCGGAGACTCAGGT -3'	NM_002777.3	111pb
Proteinase 3 (R)	5'- GCGTGAAGAAGTCAGGGAAA -3'		
GAPDH (F)	5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC -3'	NM_002046	80pb
GAPDH (R)	5'- ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAGC -3'		
Gingipaína (F)	5'-CCTACGTGTACGGACAGAGCTATA -3'	NC_010729	70pb
Gingipaína (R)	5'-AGGATCGCTCAGCGTAGCATT -3'		
Dentilisina (F)	5'-TCTTACGGAACCGAATTTGC -3'	AE017226.1	82pb
Dentilisina (R)	5'- CGT TAC CCA TCG CAA TTA CC -3'		
16S Ribossomal (F)	5'-TCGGTATTGAGGAAGGTTGG-3'	NC_015571	86pb
16S Ribossomal (R)	5'-CTGCTGGCACGGAGTTAG-3'		

As condições do PCR foram: 2 minutos a 95°C; seguindo-se de 40 ciclos da seguinte sequência: 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C seguida de uma curva de dissociação, iniciando em 60°C e finalizando em 95°C. Todas as reações foram realizadas e analisadas usando o sistema Corbett Research (Corbett Life Sciences, Qiagen). A expressão do RNAm foi quantificada utilizando o cálculo do $\Delta\Delta Ct$ ("cyclethreshold") (Pfaffl, 2001). A expressão do gene GAPDH foi utilizada como controle interno (*housekeeping*) para normalização da expressão de PAR2 e P3 e a expressão do gene constitutivo bacteriano (16S Ribossomal) para a normalização da expressão de gingipaína e dentilisina. O resultado foi expresso em unidades arbitrárias referentes à variação da taxa de indução (*fold increase*) em relação ao grupo controle (saudável).

A análise da expressão dos produtos da reação em cadeia de polimerase em tempo real (*real time* PCR) foi realizada através da especificidade da reação com SYBR green confirmada pela curva de dissociação. A linearidade e eficiência do

teste foram avaliadas previamente através da curva de diluição da amostra, pois se partindo do princípio que os “*amplicons*” duplicam-se a cada ciclo é possível determinar a eficiência de cada reação calculando-se a inclinação (*slope*) da curva padrão. As reações foram consideradas aceitáveis quando apresentaram inclinação e eficiência próximas ao ótimo (-3,322 e 1 respectivamente). Este procedimento permitiu avaliar a eficiência dos oligonucleotídeos e a melhor diluição do produto de RT a ser utilizada no presente ensaio.

4.5 Expressão proteica do PAR2

4.5.1 Extração de proteínas totais do fluido gengival

Para a padronização e expressão proteica do PAR2 por *Western blot*, às amostras (periopaper) foram adicionados 60µL de tampão [TRIS-HCl, 50mM, pH = 7,4; contendo PMSF (fenilsulfonil fluoreto) 1mM, Ortovanadato (Na₃VO₄) 2mM, Leupeptina 1mg/mL, Aprotinina 1mg/mL, Pepstatina 1mg/mL, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 2mM e Triton X-100 1%] e homogeneizadas em agitador tipo vortex a cada 5 minutos, 3 vezes. Em seguida, foram incubadas em gelo por 30 minutos. Na sequência as amostras foram centrifugadas a 12000g durante 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para novos microtubos. Posteriormente, as proteínas totais desses homogenatos foram dosadas pelo método colorimétrico BCA (ácido bicinconínico) (Thermo Scientific).

4.5.2 Separação proteica, transferência e incubação com anticorpo

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas totais foram diluídas em tampão Laemmli [TRIS-HCl 0,0625M, pH 6,8 contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001% e 2-mercaptoetanol 5%] e

fervidas durante 5 minutos. As amostras (20µg de proteínas totais para FG e 14µg para células), bem como o padrão de peso molecular de 10 a 250KDa (Thermo Scientific - EUA) foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) contendo 0,1% de dodecilsulfato de sódio (SDS - PAGE). O tampão utilizado na corrida eletroforética era composto de TRIS base (25mM), glicina (96mM) e SDS 0,1%, e a separação das proteínas foi realizada sob voltagem constante (80V), com corrente variável por aproximadamente 2 horas. Posteriormente, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por meio do aparelho de transferência eletroforética semi-seco, em voltagem constante de 15 V por 45 minutos. O cassete de transferência contendo papel filtro, gel e membrana de nitrocelulose, foi umedecido em tampão: TRIS base (20mM), glicina (150mM), metanol (20%), pH 8,0.

No dia seguinte as membranas foram lavadas três vezes durante 10 minutos com Tampão salino de Tris com *Tween* [TBS-t 0,1% pH 7,6 (20mM de TRIS-base, 0,8% de NaCl contendo 0,05% de *Tween*-20)]. Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma, com solução de BSA 5% dissolvido em tampão TBS-t. A seguir, as membranas foram incubadas *overnight* (aproximadamente 16 horas), sob agitação, em câmara fria (4°C) com o anticorpo primário específico de acordo com a tabela 4.2:

Tabela 4.2 - Anticorpos primários, secundários e diluições utilizadas para avaliação da expressão do PAR2 em células do fluido gengival

Anticorpo (AC) primário	Diluição	AC secundário	Diluição	Veículo
PAR2 (SAM11-Santa Cruz CA, EUA)	1:100	anti-camundongo	1:1000	leite 5%
GAPDH (Santa Cruz, CA, EUA)	1:1000	anti-coelho	1:2000	BSA 5%

Após o término da incubação, as membranas foram lavadas (3 vezes de 10 minutos) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpo secundário durante 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas novamente (3 vezes de 10 minutos) com tampão TBS-t. As bandas imunorreativas foram reveladas pelo kit de revelação ECL 1:1 (Thermo Scientific, EUA), e posteriormente expostas em filme radiográfico.

Após a detecção da proteína alvo as membranas foram lavadas em solução de *stripping* (62,5mM de Tris pH 6,5, 2% SDS, 100mM de 2-mercaptoetanol) por 30 minutos com agitação a 37°C. Em seguida foram lavadas 3 vezes de 5 minutos, com TBS-t e novamente submetidas ao bloqueio e incubação com o novo anticorpo.

A intensidade das bandas foi determinada por análise densitométrica, mediante o uso do software ImageJ (*National Institute of Health*). As bandas de GAPDH foram utilizadas para normalizar a expressão de PAR2 e a beta-actina para normalizar a expressão da MAPk-p38. Os valores foram expressos em unidades arbitrárias (AU).

4.6 Avaliação da expressão do PAR2 por leucócitos e células epiteliais do fluido gengival

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a presença do PAR2 na superfície das células do fluido gengival. Amostras de fluido gengival, coletadas pela técnica de lavagem intracrevicular modificada (Salonen; Paunio, 1991), foram centrifugadas a 1800rpm, 4°C durante 10 minutos e resuspensas em 200µl de PBS (pH 7,2, Gibco Invitrogen® Brasil). Dez microlitros das amostras foram utilizadas para a contagem celular em Câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial de células, 30µl de solução foram depositadas em microcentrífuga (Cytospin, Thermo Scientific Shandon, EUA) para a adesão celular em lâminas, e a contagem foi realizada em microscopia de luz com um aumento de 100x. Trezentas células foram contados em cada lâmina, diferenciando neutrófilos de células epiteliais por suas características morfológicas e determinando sua proporção para cada indivíduo. A seguir, as células amostrais foram incubadas com 2,5µl da solução Human TruStain FcX™ 5µg/mL (Biolegend, EUA) por 10 minutos, no escuro, para bloqueio de ligações inespecíficas. Após novo processo de lavagem com PBS, as células amostrais foram incubadas durante 45 minutos, no escuro, com 2µl de anticorpo específico para células epiteliais (Citokeratin 19, PerCP 200µg/mL), receptor PAR2 (PAR-2/SAM-11, FITC, 200µg/ml), e 1,5µl de anticorpo para células leucocitárias (CD45, PE, 200µg/ml) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Após novo processo

de lavagem com PBS as amostras foram levadas imediatamente para a análise por citometria de fluxo.

Para cada amostra, até 10000 eventos foram adquiridos. A análise por citometria de fluxo foi realizada com FACScalibur (Becton Dickinson®, EUA) e os eventos registrados foram analisados através do software Cell Quest (Becton Dickinson®, EUA). A expressão de receptor PAR2 em células epiteliais e leucocitárias foi determinada como a porcentagem de células positivas.

4.7 Avaliação de inibidores de proteases e biomarcadores inflamatórios no fluido gengival

As quatro tiras de papel, armazenadas no mesmo microtubo foram eluídas em 400µL de PBS, e em seguida agitadas três vezes por 30 segundos. As tiras de papel foram então descartadas e as amostras foram centrifugadas a 10000g por 10 minutos a 4°C. As quantidades de elafina e inibidor de protease secretada pelos leucócitos (SLPI) nas amostras de fluido gengival foram determinadas em duplicata através do kit de imunoensaio ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). As amostras foram diluídas em 100µL da solução estéril de fosfato de sódio a 0,01M, pH 7.4 e em seguida depositadas em microplacas. As concentrações de inibidores de protease foram calculadas pelo Softmax Molecular Devices (Menlo Park, CA, EUA).

Para determinar os níveis de IL-6 e IL-8, TNF- α , HGF, VEGF, MMP-1, MMP-2 e MMP-8, o sobrenadante das amostras de fluido gengival foi lido em duplicata com o auxílio de um kit Bio-Plex (Human VersaMAP Multiplex Development System; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). O imunoensaio foi lido em sistema Bio-Plex suspension array e os dados foram analisados através do software Bio-Plex Manager, versão 4.0.

4.8 Isolamento de neutrófilos periféricos do sangue

Os experimentos que avaliaram a participação do PAR2 *in vitro* na ativação da via de sinalização MAPK-p38, produção de superóxido e fagocitose foram realizados durante o estágio pesquisa no exterior, através de bolsa FAPESP (BEPE) processo nº 2012/22439-1 (Anexo F), no Forsyth Institute, Cambridge, Massachusetts (EUA), no período de fevereiro de 2013 a fevereiro de 2014. Para essas análises foram utilizados neutrófilos do sangue periférico humano. Os participantes foram previamente selecionados e informados sobre a natureza do estudo, e em seguida assinaram um termo de consentimento, previamente aprovado pelo Institutional Review Board (IRB) - Forsyth Institute (IRB) protocolo 11-06 (Anexo G).

Aproximadamente 50mL de sangue venoso periférico de seis pacientes periodontalmente saudáveis, com idade variando de 30 a 56 anos, de ambos os sexos foram coletados em tubos a vácuo (Vacuteiner, BD, EUA), contendo 25U/mL de heparina. Polimorfonucleares (PMNs) foram isolados através de gradiente de centrifugação. Em cada tubo de 15mL foram adicionados 3mL de Histopaque® 1119 (Sigma-Aldrich, EUA) e 2mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, EUA). Cuidadosamente, 4 a 6mL de sangue foram adicionados e em seguida centrifugados durante 15 minutos a 2000rpm em temperatura ambiente. Em seguida, uma pipeta Pasteur estéril foi usada para remoção e transferência da camada de PMN para um tubo de 50mL. Após a adição de PBS, as células foram centrifugadas durante 10 minutos em 900rpm. Após a remoção do sobrenadante foi adicionado ao *pellet* o tampão de lise NH₄Cl (4°C) e após 10 minutos as células foram centrifugadas novamente. Ao *pellet* foi adicionado 1mL de PBS, as células viáveis foram identificadas com auxílio de azul de Trypan (Sigma Aldrich, EUA), contadas e ajustadas na concentração de 25×10^6 células/mL.

4.9 Avaliação do papel da ativação do PAR2 sobre a expressão da via de sinalização intracelular MAPK-p38 em e neutrófilos humanos.

Para a análise da expressão proteica da MAPK-p38 ($n = 4$) foram usados neutrófilos humanos 3×10^6 células/amostra. Os neutrófilos foram testados nas seguintes condições:

1. Sem tratamento (controle);
2. Tratados com tripsina (5U/mL), 10 minutos;
3. Tratados com FSLLRY 214 μ M (PAR2 antagonista), 10 minutos;
4. Infectados ou não com a cepa de *P. gingivalis* A7436 (*wild type* - Forsyth Institute), 2 horas.

Para a extração de proteínas totais de neutrófilos do sangue periférico humano, após incubação, as amostras eram centrifugadas durante 5 minutos em 450g, lavadas com PBS e incubadas em movimento com 125 μ L de CellLyticTMM cell lysis reagent (Sigma-Aldrich, EUA) durante 15 minutos. Logo após ocorria nova centrifugação durante 15 minutos em 13000g e o sobrenadante coletado. Na sequência, as amostras eram centrifugadas a 12000g durante 15 minutos para separação dos debris celulares, e o sobrenadante era armazenado imediatamente em biofreezer. Posteriormente, as proteínas totais desses homogenatos foram dosadas pelo método colorimétrico BCA (Novagen BCA Protein Assay Kit, EUA).

Em seguida foi realizada a separação proteica, transferência, incubação com os anticorpos e análise densitométrica conforme descrição no item 4.5.2.

Os anticorpos primários e secundários utilizados nesse experimento bem como suas diluições estão listados na tabela 4.3:

Tabela 4.3 - Aticorpos primários, secundários e diluições utilizadas para avaliação da expressão da MAPK-p38 em neutrófilos humanos

Anticorpo (AC) primário	Diluição	AC secundário	Diluição	Veículo
MAPK-p38 fosfo (9211.Cell Signiling)	1:1000	anti-coelho	1:2000	BSA 5%
MAPK-p38 total (NB110-96875 Novus)	1:1000	anti-camundongo	1:2000	leite 5%
Beta-actina (4970 Cell Signiling, EUA)	1:2000	anti-coelho	1:5000	leite 5%

4.10 Produção de superóxido por neutrófilos do sangue periférico humano e células HL-60

4.10.1 Cultura de células HL-60

A linhagem de células promielocíticas (Collins et al., 1977) HL-60 (American Type Culture Collection, ATCC, EUA) foram mantidas em meio de cultura IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, ATCC), acrescido de soro fetal bovino 10%. Para que ocorresse a diferenciação em células do tipo neutrófilo, as mesmas foram incubadas durante seis dias em frascos contendo o meio RPMI (ATCC 1640) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1,25% de dimetilsulfóxido (DMSO) de acordo com as instruções do fabricante. Após a diferenciação as células tipo neutrófilos HL-60 foram resuspensas em PBS na concentração de 25×10^6 células/mL.

A produção de superóxido (O_2^-), tanto por PMN ($n = 6$) quanto pelas células HL-60 ($n = 3$) foi monitorada em espectrofotômetro (Spectramax 340 PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a $37^\circ C$, através da redução de citocromo c (1,5mg Cyto. C/1mL GBSS) (Sigma Aldrich, EUA), detectada a uma absorbância de 550nm e tendo como controle a superóxido dismutase (SOD) (0,5mg SOD/1mL ddH₂O) (Sigma Aldrich). As mensurações ocorreram logo após o tratamento com o antagonista seletivo do PAR2 (FSLRY) (214 μ M) (Tocris Bioscience, EUA) (Zeng et al., 2013) ou com Tripsina (5U/mL) (Sigma Aldrich) (Holzhausen et al., 2010), durante 10 minutos, tanto para neutrófilos quanto para as células HL-60. Para essa análise foram usadas $0,5 \times 10^6$ células por poço, resuspensas em 20 μ L de PBS. O estímulo ocorreu pela adição às amostras de PBS ou fMLP (4×10^{-7}) (do inglês *formyl-methionyl-leucyl-phenylalanina*) um estímulo quimiotático bacteriano de PMNs. A quantidade de superóxido produzida foi avaliada sob condições de linearidade e expressa em O_2^- /minuto/célula.

4.11 Fagocitose dos neutrófilos em citometria de fluxo

Para avaliar a influência do receptor PAR2 na capacidade de fagocitose dos neutrófilos, células do sangue periférico humano foram utilizadas e neutrófilos ($n = 6$) foram isolados através de gradiente de centrifugação e ajustados a uma concentração de 25×10^6 células/mL. *P. gingivalis* (A7436 - *wild type*) foram previamente lavadas com PBS e ajustadas na concentração de 1×10^9 /mL de PBS sendo ajustadas para uma multiplicidade de infecção (MOI) de 20. Para a marcação das bactérias foi utilizado CellTrace™ CFSE (Invitrogen, EUA), durante 15 minutos no escuro a 4°C em agitação, e em seguida 20 minutos no escuro em temperatura ambiente. A opsonização foi realizada com plasma humano manufaturado (Sigma Aldrich, EUA), durante 30 minutos a 37°C, no escuro em agitação. Imediatamente após, as cepas de *P. gingivalis* foram lavadas com PBS, centrifugadas a 1500rpm (5 minutos) e resuspensas em PBS. Três grupos de neutrófilos foram preparados em microtubos, em triplicata para incubação. O primeiro grupo contendo somente neutrófilos, o segundo contendo neutrófilos e *P. gingivalis* (A7436) e o terceiro grupo contendo neutrófilos tratados previamente com o antagonista do PAR2 (FSLRY) (214μM) e *P. gingivalis* (A7436). Após 2 horas de incubação a 37°C as amostras foram lavadas com PBS e resuspensas em 500μL de PBS para leitura em citometria de fluxo (BD FACS Aria SORP flow cytometer/cell sorter, EUA). Para cada amostra, 10000 eventos foram adquiridos.

4.12 Análise Estatística

Comparações entre pré e pós-tratamento bem como entre sítios saudáveis e doentes (dentro do grupo periodontite) foram analisados pelo teste t pareado. As diferenças entre o grupo periodontite crônica e o grupo controle foram avaliadas pelo teste t não pareado. O sangramento à sondagem foi avaliado pelo teste qui-quadrado. O teste de correlação linear foi utilizado nas análises de correlação e o coeficiente de correlação de Pearson foi usado para calcular a correlações bivariadas entre as covariâncias.

O teste ANOVA foi utilizado para calcular a diferença entre os grupos PMN, tripsina e FSLLRY no ensaio de produção de superóxido e também para calcular a diferença entre os grupos PMN (controle), tripsina e FSLLRY em relação à expressão da MAPK-p38. O teste t pareado foi utilizado para comparar a capacidade de fagocitose entre os grupos PMN e FSLLRY, bem como para as comparações de expressão da MAPK-p38 entre PMN (controle) e PMN infectados com a *P. gingivalis* A7436.

As análises e gráficos deste estudo foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 4.0. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados são expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP).

5 RESULTADOS

5.1 Características dos pacientes

Trinta e um pacientes com periodontite crônica moderada (PC) foram pareados com indivíduos controle de acordo com idade e sexo. De acordo com a tabela 5.1 não foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo PC e grupo controle em relação à média de idade ($P = 0,7601$).

Tabela 5.1 - Dados demográficos e características clínicas dos pacientes do grupo controle e grupo periodontite crônica moderada no início e seis semanas após o tratamento periodontal não-cirúrgico

Característica	Grupos (média ± DP)		
	Controle	Periodontite crônica moderada	
N	31	31	
Idade (anos)/(variação)	43,16 ± 9,60 (24 - 63)	44,12 ± 9,08 (21 - 64)	
20-35 anos (N)	6	6	
36-50 anos (N)	18	18	
51-65 anos (N)	7	7	
Sexo (fem/masc)	17/14	17/14	
Dentes (N)/(variação)	26,54 ± 1,92 (24 - 28)	23,25 ± 3,17 (18 - 28)	
Parâmetros periodontais		Início (PC)	6 semanas (PCT)
Média PS (mm)	1,80 ± 0,27	2,99 ± 0,65 *	2,35 ± 0,49 * †
Média NIC (mm)	2,31 ± 0,34	3,77 ± 0,69 *	3,38 ± 0,74 * †
SS (%)	3,43 ± 3,02	63,37 ± 23,31*	17,64 ± 24,75 * †
Média IP	0,17 ± 0,13	1,43 ± 0,45 *	0,31 ± 0,38 * †
Média IG	0,11 ± 0,12	1,76 ± 0,42 *	0,54 ± 0,47 * †

N, número de participantes; DP, desvio padrão. *Estatisticamente diferente comparado ao grupo controle, $P < 0,05$. [†] Estatisticamente diferente comparado ao início, $P < 0,0001$

No início do estudo a média dos valores de PS, NCI, SS e IG foram significativamente maiores ($P < 0,0001$) nos indivíduos do grupo PC comparados aos indivíduos do grupo controle. Após o tratamento periodontal não-cirúrgico os indivíduos mostraram uma significativa melhora comparada ao início (PCT *versus* PC; $P < 0,0001$). Entretanto, a média dos valores dos parâmetros clínicos do grupo PC após o tratamento foram ainda maiores comparados ao grupo controle (PS, NIC, IG $P < 0,0001$, SS, $P = 0,0017$, e IP, $P = 0,0407$) (Tabela 5.1).

A tabela 5.2 mostra que os parâmetros clínicos e o volume do fluido gengival de amostras dos sítios periodontais do grupo PC foi significativamente maior ($p < 0,05$) comparado aos sítios do grupo controle. Sítios saudáveis e sítios tratados (PCT) do grupo PC mostraram uma significativa redução em relação a PS, NIC e volume do FG comparados aos sítios doentes no início do estudo ($P < 0,0001$).

Tabela 5.2 - Parâmetros clínicos e volume (V) do FG dos sítios periodontais do grupo controle e grupo PC no início e seis semanas após o tratamento periodontal

Parâmetros	Grupos (Média $\pm$ DP)			
	Controle	Periodontite crônica moderada		
		Início (PC)	6 semanas (PCT)	Sítios saudáveis
PS (mm)	2,08 $\pm$ 0,04	5,61 $\pm$ 0,13 *	3,20 $\pm$ 0,13 [†]	2,65 $\pm$ 0,08 [†]
NIC (mm)	2,14 $\pm$ 0,05	6,53 $\pm$ 0,17 *	4,19 $\pm$ 0,17 * [†]	3,18 $\pm$ 0,13 [†]
FG (μ L)	0,30 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,05 *	0,41 $\pm$ 0,04 * [†]	0,37 $\pm$ 0,05 [†]

DP, desvio padrão * Estatisticamente diferente comparado ao grupo controle $P < 0,05$. [†] Estatisticamente diferente comparado ao PC no início $P < 0,0001$

5.2 A expressão do PAR2 em células do fluido gengival é reduzida após o tratamento periodontal

A expressão da média do RNAm do PAR2 em células do fluido gengival em pacientes com periodontite crônica foi significativamente maior comparada a média da expressão dos sítios de indivíduos periodontalmente saudáveis ($P = 0,0003$) e significativamente reduzida após o tratamento periodontal não-cirúrgico ($P < 0,0001$)

(figura 5.1 A). Níveis de proteína do PAR2, avaliados pela técnica de *western blot*, também se encontraram elevados em pacientes com periodontite crônica, comparados aos controles ($P = 0,0384$) (figura 5.1 B).

Figura 5.1 - Expressão do RNAm do PAR2 no FG dos grupos controle, periodontite crônica (PC) antes e depois do tratamento periodontal não-cirúrgico (PCT), e sítios saudáveis do grupo periodontite crônica (PC) (A). Análise da expressão proteica do PAR2 no grupo controle, PC, PCT e sítios saudáveis do grupo PC (B). Ao topo da figura B, quantificação densitométrica do *western blot* de todos os grupos representados no gráfico correspondente. Dados expressos em média $\pm$ DP; * $P < 0,05$ comparados aos valores do grupo controle; † $P < 0,05$ comparados aos valores do grupo PC

Seis semanas após o tratamento esses níveis foram significativamente reduzidos ($P = 0,0074$). O tratamento periodontal não somente reduziu a expressão do RNAm do receptor, mas também diminuiu os níveis de proteínas transcritas. Além disso, sítios periodontalmente saudáveis de pacientes com periodontite crônica mostraram uma expressão diminuída do RNAm do PAR2 ($P = 0,0092$) bem como seus níveis de proteína ($P = 0,0413$), comparados aos sítios periodontais dos mesmos pacientes (figuras 5.1 A e 5.1 B). Interessantemente, houve uma forte correlação positiva ($r = 0,8935$) entre a expressão do RNAm do PAR2 e seus níveis de proteína, bem como o RNAm do PAR2 e a média de PS ($r = 0,6308$) e NIC ($r = 0,7741$) (tabela 5.3).

Figura 5.2 - Gráfico de dispersão representando a correlação positiva entre a média do RNAm e a média da expressão proteica do PAR2 ($r = 0.8935$)

5.3 Leucócitos e células epiteliais do fluido gengival expressam o PAR2

A análise através de citometria de fluxo demonstrou que leucócitos são mais prevalentes do que células epiteliais em amostras de FG ($P < 0,05$). A diferença entre leucócitos e células epiteliais no FG foi similar para amostras do grupo controle e PC. Entretanto, pacientes do grupo PC mostraram maiores níveis de células (tanto leucócitos quanto células epiteliais) expressando PAR2 comparados ao pacientes do grupo controle ($P < 0,001$) (figura 5.3).

Figura 5.3 - Expressão do PAR2 em células epiteliais presentes no FG em pacientes controle e PC. Dados expressos em média $\pm$ DP; *P < 0,05 comparados aos valores do grupo controle

Para a detecção de células expressando o PAR2, as populações celulares do FG foram primeiramente tratadas apenas com o anticorpo para bloqueio de ligações inespecíficas (Human TruStain FCX™, 5 μ g/ml, BioLegend, Califórnia, EUA) e submetidas à análise através de citometria de fluxo (controle negativo) (figura 5.4).

Figura 5.4 - Dados representativos ilustrando as estratégias de aquisição celular para análise por citometria de fluxo. Células do FG sem marcação foram usadas para determinar o controle negativo (I). Total de leucócitos (PAR2 x CD45) e células epiteliais (PAR2 x Cyt19) na mesma amostra (II). Expressão de PAR2 em leucócitos (painel da esquerda) e células epiteliais (painel da direita) (III)

Após a determinação desses controles, amostras do mesmo indivíduo foram tratadas com anticorpos específicos (CD45 ou Cyt19 e PAR-2/SAM-11) para determinar a expressão do PAR2 em células epiteliais e leucócitos baseando-se em dados do controle negativo de cada indivíduo, onde foi determinada a população (%) de células epiteliais e leucocitárias que expressam PAR2 em suas superfícies (figura 5.5).

Figura 5.5 - Esquema representativo dos dados de citometria de fluxo para avaliação das células que expressam PAR2 (leucócitos e células epiteliais), em FG de pacientes do grupo PC (A, B, C e D) e C (E, F, G e H). População celular (controle negativo) de pacientes do grupo PC sem a presença de anticorpos específicos para marcação das células alvo (A e C). Representação de leucócitos que não expressam PAR2 (Q1) e leucócitos que expressam PAR2 (Q2) no grupo PC (B). Células epiteliais que não expressam PAR2 (Q1) e células epiteliais que expressam PAR2 (Q2) no grupo PC (D). População celular (Controle Negativo) de pacientes do grupo Controle sem a presença de anticorpos específicos para marcação das células alvo (E e G). Leucócitos que não expressam PAR2 (Q1) e leucócitos que expressam PAR2 (Q2) no grupo de Controle (F). Células epiteliais que não expressam PAR2 (Q1) e células epiteliais que expressam PAR2 (Q2) no grupo Controle (H)

5.4 A expressão do PAR2 em células do FG está associada com a presença de seus potenciais ativadores presentes na bolsa periodontal

A média da expressão do RNAm da gingipaína foi significativamente menor em pacientes controles comparada aos pacientes do grupo PC ($P = 0,0004$). Após o tratamento periodontal, a expressão do RNAm tanto da gingipaína quanto da dentilisina diminuiu significativamente ($P = 0,0039$ e $P = 0,0234$, respectivamente, figuras 5.6 A e 5.6 B). A expressão do RNAm da gingipaína foi também significativamente menor em sítios saudáveis comparado aos sítios periodontalmente afetados no mesmos indivíduos do grupo PC ($P = 0,0438$, figura 5.6 A). Além disso, o tratamento periodontal também diminuiu a média da expressão do RNAm da P3 em pacientes com periodontite crônica moderada ($P = 0,0108$, figura 5.6 C).

Figura 5.6 - Expressão do RNAm da gingipaína no grupo controle e no grupo periodontite antes (PC) e depois do tratamento periodontal não cirúrgico (PCT), e sítios saudáveis do grupo PC (A). Expressão do RNAm da dentilisina (B) e P3 (C) no grupo periodontite antes (PC) e seis semanas após o tratamento periodontal não-cirúrgico (PCT). Dados expressos em média $\pm$ DP; * $P < 0,05$ comparados aos valores do grupo controle; † $P < 0,05$ comparados aos valores do grupo PC

Níveis do inibidor de protease SLPI foram significativamente menores no grupo PC em comparação aos pacientes do grupo controle ($P = 0,0385$). Após o tratamento os níveis de SLPI aumentaram, entretanto esse aumento não foi significativo ($P > 0,05$, figura 5.7 A). Por outro lado, níveis de elafina não foram diferentes entre os grupos. Apesar de o grupo controle mostrar uma tendência a valores maiores, essa diferença não foi significativa ($P = 0,1422$, figura 5.7 B).

Figura 5.7 – Níveis de SLPI (A) e elafina (B) no FG de pacientes do grupo controle e pacientes do grupo periodontite antes (PC) e depois do tratamento periodontal não-cirúrgico (PCT). Dados expressos em média $\pm$ DP; $n = 8$ por grupo; * $P < 0,05$ comparados aos valores do grupo controle

Interessantemente, houve uma forte correlação entre o RNAm do PAR2 e a expressão do RNAm tanto da gingipaína quanto da P3 ($r = 0,72$, e $r = 0,49$, respectivamente). Além disso, uma correlação inversa foi observada entre o RNAm do PAR2, o RNAm da dentilisina e níveis de SLPI ($r = -0,64$, e $r = -0,43$, respectivamente) (tabela 5.3).

5.5 A expressão do PAR2 esta associada ao aumento dos níveis de biomarcadores inflamatórios no fluido gengival

Níveis de IL-6 (A), IL-8 (B), TNF- α (C), MMP-2 (E), MMP-8 (F), HGF (G) e VEGF (H) no FG estavam aumentados em pacientes do grupo PC comparado ao grupo controle ($P < 0,05$), sendo significativamente reduzidos após o tratamento periodontal ($P < 0,05$) (figura 5.8). De modo interessante, uma forte correlação foi encontrada entre o RNAm do PAR2 e os níveis de FG de IL-6, IL-8, TNF α , HGF e VEGF ($r > 0,55$) (tabela 5.3).

Figura 5.8. Níveis de IL-6 (A), IL-8 (B), TNF- α (C), MMP-1 (D), MMP-2 (E), MMP-8 (F), HGF (G), e VEGF (H) do FG de pacientes dos grupos controle, periodontite antes e após o tratamento periodontal não-cirúrgico. Dados expressos em média $\pm$ DP; n = 8 por grupo; *P < 0,05 comparados aos valores do grupo controle. † P < 0,05 comparados aos valores do grupo PC

Tabela 5.3 – Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre o RNAm do PAR2 e PD, NIC, expressão proteica do PAR2, mRNA da gingipaína, SLPI, IL-6, IL-8, TNF- α , MMP-1, HGF e VEGF.

Parâmetros	RNAm PAR ₂ (r)	Interpretação
1) PD (mm)	0,6308	Forte
2) NCI (mm)	0,7741	Forte
3) Proteína PAR2	0,8935	Muito forte
5) mRNA gingipaína	0,7247	Forte
8) SLPI	-0,4345	Inversa
9) IL-6	0,7214	Forte
10) IL-8	0,7466	Forte
11) TNF- α	0,6323	Forte
12) MMP-1	-0,4517	Inversa
16) HGF	0,6354	Forte
17) VEGF	0,6396	Forte

5.6 Infecção por *P. gingivalis* ativa MAPK-p38 independente do PAR2

Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) com relação à expressão de MAPK-p38 total entre neutrófilos do sangue periférico humano de pacientes periodontalmente saudáveis infectados ou não infectados com *P. gingivalis* A7436 (figura 5.9 A). No entanto, a expressão de MAPK-p38 fosforilada foi maior em neutrófilos infectados com *P. gingivalis* A7436 em relação a neutrófilos não infectados ($P < 0,05$) (teste t pareado) (figura 5.9 B).

Um significativo aumento na expressão proteica da MAPK-p38 ($P < 0,05$) foi observado quando neutrófilos foram incubados com *P. gingivalis* A7436 em relação à expressão observada em neutrófilos não infectados. O antagonismo do PAR2 por FSLLRY não levou a alteração na expressão da MAPK-38 em neutrófilos infectados com *P. gingivalis* ($P > 0,05$). Ainda, neutrófilos tratados com tripsina, previamente a incubação com *P. gingivalis*, não mostraram diferença significativa em relação à expressão da MAPK-p38 comparado ao grupo de neutrófilos não infectados (ANOVA) (figura 5.10).

Figura 5.9 – Expressão proteica da MAPK-p38 total (A) e fosforilada (B) após infecção dos neutrófilos pela *P. gingivalis* A7436. Ao topo da figura A e B, quantificação densitométrica do *western blot* dos grupos representados nos gráficos correspondentes. Dados expressos em média $\pm$ DP; n = 4 por grupo; *P < 0,05 comparados aos valores do grupo controle (PMN)

Figura 5.10 - Expressão proteica da MAPK-p38 fosforilada após infecção dos neutrófilos pela *P. gingivalis* A7436 tratados previamente com tripsina (PMN + Tripsina) e o antagonista do PAR2 (FSLLRY). Ao topo da figura, quantificação densitométrica do *western blot* dos grupos representados no gráfico correspondente. Dados expressos em média $\pm$ DP; n = 4 por grupo; **P < 0,05 comparados aos valores do grupo controle (PMN)

5.7 PAR2 influencia a produção de superóxido em PMNs e células HL-60

Neutrófilos do sangue periférico humano ($n = 6$) (figura 5. 11 A) e células HL-60 ($n = 3$) (figura 5.11 B) foram tratados com o antagonista do PAR2 (FSLRY) (240 μ M) e com tripsina (5U/mL) e avaliados em relação à produção de superóxido. As células foram estimuladas com PBS e fMLP (4×10^{-7}). Após o estímulo com fMLP houve um aumento significativo ($P < 0,05$) na produção de superóxido nos grupos de células controle (PBS) e células tratadas com tripsina. Entretanto em células tratadas com o antagonista do PAR2 (FSLRY) a produção de superóxido foi significativamente reduzida tanto em PMNs (A) quanto em células HL-60 (B) ($P < 0.05$), 80 e 70% respectivamente (ANOVA).

Figura 5.11 - Produção de superóxido (O_2^-) por neutrófilos (A) e células HL-60 (B) previamente tratados com Tripsina e o antagonista PAR2 (FSLRY), estimulados por fMLP (+), comparados aos grupos não estimulados (-). Dados expressos em média $\pm$ DP; $n = 6$; * $P < 0,05$ comparados aos valores do grupo PBS, Tripsina e FSLRY + fMLP

5.8 PAR2 não influencia na capacidade de fagocitose de neutrófilos

Neutrófilos humanos de pacientes periodontalmente saudáveis ($n = 6$) foram tratados com o antagonista do PAR2 (FSLLRY) ($240\mu\text{M}$) e incubados durante 2 horas com *P. gingivalis* (A7436). Após incubação, a análise realizada em citometria de fluxo mostrou que o antagonismo do PAR2 (+) não alterou a capacidade total de fagocitose dos neutrófilos ($P > 0,05$), comparado ao grupo controle (neutrófilos não tratados) (-) (teste t pareado). A figura 5.12 (A) mostra a capacidade total de fagocitose (%) de neutrófilos em relação a *P. gingivalis* nos grupos tratados com o antagonista do PAR2 (+) e não tratados (-) ($P > 0,05$). A figura 5.12 (B) mostra a diferença na eficiência da fagocitose (%) entre neutrófilos no grupo tratado com PAR2 antagonista (+) e não tratados (-) ($P > 0,05$).

A)

Capacidade total de fagocitose (%)

B)

Figura 5.12 - Comparação da capacidade de total de fagocitose (%) de neutrófilos tratados (+) ou não (-) com o antagonista do PAR2 (FSLRY) e infectados pela *P. gingivalis* (A7436) ($P > 0,05$) (A). Os intervalos P2 à P6 na figura B mostram a eficiência da fagocitose (%) pelo neutrófilo em relação a *P. gingivalis* (A7436) entre os grupos tratados (+) ou não (-) com o antagonista do PAR2 ($P > 0,05$). Dados expressos em média $\pm$ DP; $n = 6$

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que células epiteliais e leucócitos presentes no fluido gengival expressam o PAR2 e que a presença de potenciais ativadores desse receptor, como a gingipaína e P3, além de seus inibidores como a SLPI e elafina influenciam essa expressão. Em pacientes com periodontite crônica, o aumento da expressão genica e proteica do PAR2 foi positivamente associado à inflamação e a destruição periodontal bem como aos elevados níveis de IL-6, IL8 e TNF- α , MMP-2, MMP-8, HGF e VEGF. O aumento da expressão do RNAm da gingipaína e redução dos níveis de dentilisina e SLPI também foram associados à superexpressão do PAR2. Ainda, a melhora dos parâmetros clínicos periodontais após seis semanas de tratamento foi positivamente correlacionada à redução da expressão do PAR2, seus ativadores e mediadores pró-inflamatórios. Além disso, a expressão do PAR2 em neutrófilos humanos foi diretamente associada à produção de superóxido.

Os resultados do presente estudo fortalecem a hipótese de que o PAR2 participa ativamente do processo inflamatório da doença periodontal. A redução da expressão desse receptor em células do FG após o tratamento da doença periodontal sugere que a sua atividade, em pacientes com periodontite crônica, está correlacionada diretamente com a presença da infecção, e provavelmente, o seu funcionamento não está associado a uma característica constitutiva do indivíduo, a qual poderia propiciar a inflamação periodontal.

Dessa forma o mapeamento de agonistas e antagonistas, endógenos e exógenos do PAR2, da cooperatividade entre receptores, bem como das vias de sinalização celulares que culminam na produção de citocinas pró-inflamatórias, implica em conhecimento fundamental da patogênese da doença periodontal permitindo futuras abordagens no manejo de sua progressão.

Estudos prévios demonstraram que gingipaínas Rgps e Kgp, aumentam sinergicamente a secreção de citocinas pro-inflamatórias em monócitos humanos via PARs em combinação com receptores do tipo TOLL ou NOD (Uehara et al., 2008). Sabe-se que as gingipaínas podem ativar o PAR2 em células inflamatórias imunes e células da barreira epitelial oral levando ao aumento de mediadores pro-

inflamatórios, como IL-6, IL-8, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , e MMPs (Lourbakos et al., 2001; Holzhausen et al., 2006; Giacaman et al., 2009; Moraes et al., 2008; Lee et al., 2007; Yun et al., 2007) e à ativação de vias de sinalização como a via MAPK e fator nuclear kappa B (NFkB), as quais estão associadas com o aumento da resposta inflamatória (Macfarlane et al., 2001). Além disso, a P3 demonstrou ativar o PAR2 em células do hospedeiro induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Ikawa et al., 2005; Uehara et al., 2007), as quais tem um papel direto na destruição periodontal, além de afetar indiretamente a regulação de MMPs. Dessa forma, há evidência suficiente na literatura que demonstram que tanto a gingipaína quanto a P3 ativam o PAR2 exacerbando a inflamação na doença periodontal crônica. De acordo com o presente estudo, demonstramos que pacientes com periodontite crônica apresentaram um aumento da expressão do PAR2 associado aos parâmetros de inflamação clínica. Ainda, nesse estudo, os mesmos pacientes antes do tratamento, mostraram um aumento da expressão do PAR2 associado a um aumento da expressão de proteases e aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela destruição periodontal.

O SLPI é expresso em células epiteliais e imunes agindo como inibidor de proteases mediando assim os efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos. No presente estudo, níveis reduzidos de SLPI foram encontrados em pacientes com periodontite crônica. Entretanto, o tratamento periodontal levou a sua regulação. As atividades das serino proteases são cruciais para a ativação do PAR2. Nesse estudo, níveis reduzidos de SLPI foram associados ao aumento da expressão da protease gingipaína e P3 e ao aumento da expressão do PAR2. De modo semelhante, foi demonstrado que a redução dos níveis de SLPI e altos níveis de serino proteases em mucosa gástrica infectada por *Helicobacter pylori* foram correlacionados com uma superexpressão de PAR2 (Kandulski et al., 2011). Ainda, foi também demonstrado que a redução dos níveis de SLPI em sítios infectados por *P. gingivalis* pode ser explicada pela habilidade da gingipaína em reduzir e degradar essa substância (Into et al., 2006; Kantyka et al., 2009; Yin et al., 2010). A redução nas concentrações de SLPI pode estar associada à perda da capacidade de proteção do hospedeiro e aumento da susceptibilidade a destruição periodontal. Esses dados reforçam o papel da gingipaína na ativação do PAR2 na inflamação (Fagundes et al., 2011).

No presente estudo, demonstramos ainda que pacientes com periodontite apresentaram elevados níveis de HGF no fluido gengival, em concordância com outros estudos na literatura (Nagaraja; Pradeep, 2007; Rudrakshi et al., 2011; Lönn et al., 2014). Foi observada também uma diminuição na concentração de HGF após o tratamento periodontal. O receptor de HGF é expresso principalmente por células epiteliais e fibroblastos gengivas humanos onde acredita-se mediar várias interações entre os tecidos. O HGF estimula a produção de MMPs e a formação de vasos sanguíneos através do aumento da expressão de VEGF, o qual tem um papel fundamental na remodelação e cicatrização teciduais (Nagaraja; Pradeep, 2007, Rudrakshi et al., 2011; Lönn et al., 2014). De acordo com esses achados, no presente estudo, níveis elevados de HGF foram associados ao aumento de MMP-2, MMP-8 e VEGF no fluido gengival sendo correlacionados com a superexpressão de PAR2, ao aumento da expressão da gingipaína e de mediadores pró-inflamatórios. Uma vez que produção de HGF por fibroblastos gengivais humanos pode ocorrer sob estímulo da Rgp através da ativação do PAR2 (Uehara et al., 2005), os resultados deste estudo sugerem que a gingipaína pode ativar o PAR2 em células do fluido gengival levando ao aumento da secreção de HGF nos tecidos inflamados.

A *Treponema denticola* (*T. denticola*) é uma bactéria anaeróbia particularmente associada com a periodontite severa e refratária. *T. denticola* produz a quimiotripsina protease chamada dentilisina, a qual pode degradar uma variedade de proteínas humorais, incluindo componentes da membrana, serino proteases e peptídeos bioativos (Chi et al., 2003). Além disso, sugere-se que a dentilisina causa o desarme ou inibição do PAR2 prévios a uma futura ativação por uma protease tipo tripsina (Holzhausen et al., 2006). De modo interessante, foi demonstrada uma relação inversa entre a expressão do PAR2 e da dentilisina em sítios com doença periodontal, sugerindo que proteases bacterianas produzidas por outros patógenos periodontais poderiam também desenvolver um papel na ativação ou supressão do PAR2. Investigações adicionais explorando os efeitos de outras proteases bacterianas sobre esse receptor na doença periodontal devem ser realizadas.

Em conformidade com a literatura, no presente estudo a presença de leucócitos no fluido gengival foi mais prevalente quando comparado às células epiteliais. Além disso, foi observada uma expressão significativamente maior de leucócitos expressando PAR2 em pacientes com periodontite crônica quando

comparada a expressão do PAR2 por células dos pacientes do grupo controle. Esses resultados sugerem que o aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com periodontite crônica bem como a relevância da expressão do PAR2 em leucócitos, em especial neutrófilos no fluido gengival, durante a inflamação dos tecidos periodontais.

Uma vez que o antagonismo do PAR2, durante a infecção pela *P. gingivalis* em neutrófilos humanos não tenha repercutido num significativo aumento da expressão da via de sinalização MAPK-38, não seria possível dizer que essa via esteja envolvida com a ativação do PAR2.

Além da liberação de mediadores inflamatórios, os neutrófilos são especialmente importantes no estabelecimento da lesão periodontal, por reconhecerem agentes nocivos, realizarem fagocitose, e produzirem espécies reativas de oxigênio (ROS) (Matthews et al., 2007 a, b). Durante a fagocitose a enzima oxidase, localizada no fagossomo, incorpora um elétron do NADPH, o qual é altamente expresso por neutrófilos, este por sua vez libera uma molécula de oxigênio para produzir o ânion superóxido (O_2^-), o qual é precursor de espécies reativas de oxigênio. Uma série de condições patológicas é mediada pelo estresse oxidativo causado pelos neutrófilos, como artrite reumatóide, diabetes, infarto do miocárdio, doença vascular cerebral e doença inflamatória pulmonar (Morel et al., 1991; Noguera et al., 2001). Além disso, foi demonstrado por Matthews et al. (2007) que neutrófilos periféricos de indivíduos com periodontite crônica, mesmo na ausência de estímulo exógeno, demonstraram um aumento na produção de ROS extracelular *in vitro*. Ainda, neutrófilos estimulados produzem uma grande quantidade de superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio, os quais são os principais precursores do arsenal antimicrobiano oxigênio-dependente dessas células (Winterbourn; Kettle, 2013).

Apesar de muitos estudos demonstrarem principalmente as consequências da produção de superóxido pelo neutrófilo, nenhum estudo investigou a participação direta dos PARs nessa função. O antagonismo do PAR2 seguida pela significativa redução na produção de superóxido em neutrófilos periféricos humanos revela pela primeira vez a participação desse receptor em mais um importante evento relacionado à inflamação.

Nossos resultados indicam um caminho para o desenvolvimento futuro de agentes antagonistas do PAR2 ou mesmo de substâncias anti-proteolíticas como coadjuvantes no tratamento da doença periodontal. O envolvimento de outras vias de sinalização intracelular após a ativação do PAR2, além da sua participação em outras importantes funções celulares associadas à inflamação, mais especificamente à produção de mediadores pró-inflamatórios, devem ser investigados.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados do presente estudo é possível concluir que o tratamento periodontal não-cirúrgico em pacientes com periodontite crônica resultou na regulação do PAR2. Mais especificamente:

1. A presença de periodontite crônica foi associada com a presença de uma maior expressão genica e proteica ($P < 0,05$) de PAR2 em células do fluido gengival. Além disso, o tratamento periodontal resultou em uma diminuição significativa ($P < 0,05$) da expressão do PAR2 no fluido gengival.

2. A expressão do PAR2 nas células do fluido gengival de sítios saudáveis de pacientes com periodontite crônica foi significativamente menor em comparação com a expressão presente no fluido de sítios periodontalmente doentes (de pacientes com periodontite crônica).

3. A expressão do PAR2 nas células do fluido gengival de pacientes com periodontite crônica correlaciona-se positivamente com os níveis dos ativadores gingipaina e P3 e inversamente com os níveis de SLPI e dentilisina.

4. Os níveis dos biomarcadores inflamatórios IL-6, IL-8, TNF- α , MMP-2, MMP-8, HGF e VEGF apresentam-se estatisticamente elevados no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica em relação ao fluido de pacientes controle ($P < 0,05$). Ainda, o tratamento periodontal não-cirúrgico resultou na diminuição dos níveis destes biomarcadores ($P < 0,05$). Além disso, os níveis de IL-6, IL-8, TNF- α e HGF correlacionaram-se positivamente com a expressão do PAR2 no fluido gengival.

5. O fluido gengival de pacientes com periodontite crônica apresenta uma elevada expressão de PAR2 em leucócitos e células epiteliais.

6. A ativação da via de sinalização MAPK-p38 em neutrófilos humanos durante a infecção por *P. gingivalis* independe da ativação do PAR2.

7. A ativação do PAR2 em neutrófilos humanos estimulados pode levar a produção de superóxido.

8. O antagonismo do PAR2 em neutrófilos humanos não exerceu nenhum efeito sobre a capacidade de fagocitose da *P. gingivalis*.

REFERÊNCIAS¹

Abraham LA, Chinni C, Jenkins AL, Loubakos A, Ally N, Pike RN, et al. Expression of protease-activated receptor-2 by osteoblasts. *Bone*. 2000; 26:7-14.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4:1-6.

Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts*. *Periodontol 2000*. 2013;Jun;62(1):203-17.

Berglundh T, Donati M, Zitzmann N. B cells in periodontitis: friends or enemies? *Periodontol 2000*. 2007;45:51-66.

Bohm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Anderson DC, Connolly A, et al. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J*. 1996;314:1009-16.

Boitano S1, Flynn AN, Sherwood CL, Schulz SM, Hoffman J, Gruzina I, et al. *Alternaria alternata* serine proteases induce lung inflammation and airway epithelial cell activation via PAR2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011 Apr;300(4):605-14.

Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett*. 2012 Aug;333(1):1-9.

Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, et al. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest*. 2007;117:636-47.

Cenac N, Chin AC, Garcia-Villar R, Salvador-Cartier C, Ferrier L, Vergnolle N, et al. PAR2 activation alters colonic paracellular permeability in mice via IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Physiol*. 2004 Aug 1;558:913-25.

Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol*. 2003 Sep;5(9):581-92.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Chi B, Qi M, Kuramitsu HK. Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration. *Res Microbiol*. 2003;154:637-43.

Cocks TM, Moffatt JD. Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends Pharmacol Sci*. 2000; 21:103-8.

Coelho AM, Vergnolle N, Guiard B, Fioramonti J, Bueno L. Proteinases and proteinase-activated receptor 2: a possible role to promote visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology*. 2002;122:1035-47.

Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature*. 1977 Nov 24;270(5635):347-9.

Cottrell GS, Amadesi S, Pikios S, Camerer E, Willardsen JA, Murphy BR, et al. Protease-activated receptor 2, dipeptidyl peptidase I, and proteases mediate *Clostridium difficile* toxin A enteritis. *Gastroenterology*. 2007 Jun;132(7):2422-37.

Coughlin SR, Camerer E. PARticipation in inflammation. *J Clin Invest* 2003;111:25-7.

Darveau RP. The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system. *DNA Cell Biol*. 2009 Aug;28(8):389-95.

DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Déry O, Mullins RD, Bunnett NW. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol*. 2000 Mar 20;148(6):1267-81.

Dulon S, Leduc D, Cottrell GS, D'Alayer J, Hansen KK, Bunnett NW, et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 May;32(5):411-9.

Dye BA Global periodontal disease epidemiology. *Periodontol* 2000. 2012 Feb;58(1):10-25.

Fagundes JA, Monoo LD, Euzebio Alves VT, Pannuti CM, Cortelli SC, Cortelli JR, et al. *Porphyromonas gingivalis* is associated with protease-activated receptor-2 up-regulation in chronic periodontitis *J Periodontol*. 2011;82:1596-601.

Ferrell WR, Lockhart JC, Kelso EB, Dunning L, Plevin R, Meek SE, et al. Essential role for proteinase-activated receptor-2 in arthritis. *J Clin Invest*. 2003; 111:35-41.

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; 155:3238-3246.

Girardin SE, Philpott DJ, Lemaitre B. Sensing microbes by diverse hosts. Workshop on pattern recognition proteins and receptors. *EMBO Rep*. 2003a Oct;4(10):932-6.

Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol*. 2003b Dec;24(12):652-8.

Hans M, Hans VM. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J Oral Sci*. 2011 Sep;53(3):263-71.

Hansen KK, Sherman PM, Cellars L, Andrade-Gordon P, Pan Z, Baruch A, et al. A major role for proteolytic activity and proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of infectious colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(23):8363-8.

Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*. 1999 Jun;20:168-38.

Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N. Proteinase-activated receptor-2 (PAR2) agonist causes periodontitis in rats. *J Dent Res*. 2005a; 84:154-59.

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;1001:177-80.

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; 168:1189-99.

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

Ikawa K, Nishioka T, Yu Z, Sugawara Y, Kawagoe J, Takizawa T, Primo V, Nikolic B, Kuroishi T, Sasano T, Shimauchi H, Takada H, Endo Y, Sugawara S. Involvement of neutrophil recruitment and protease-activated receptor 2 activation in the induction of IL-18 in mice. *J Leukoc Biol.* 2005 Nov;78(5):1118-26.

Into T, Inomata M, Kanno Y, Matsuyama T, Machigashira M, Izumi Y, et al. Arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* deprive protective functions of secretory leucocyte protease inhibitor in periodontal tissue. *Clin Exp Immunol.* 2006; 145:545-554.

Janeway CA. Natural killer cells: a primitive immune system. *Nature.* 1989 Sep 14;341(6238):108.

Ishihara K. Virulence factors of *Treponema denticola*. *Periodontol 2000.* 2010 Oct;54(1):117-35.

Kajikawa H, Yoshida N, Katada K, Hirayama F, Handa O, Kokura S, et al.. *Helicobacter pylori* activates gastric epithelial cells to produce interleukin-8 via protease-activated receptor 2. *Digestion.* 2007;76(3-4):248-55.

Kandulski A, Kuester D, Mönkemüller K, Fry L, Malfertheiner P, Wex T. Protease-activated receptor-2 (PAR2) in human gastric mucosa as mediator of proinflammatory effects in *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2011;16:452-8.

Kanke T, Macfarlane SR, Seatter MJ, Davenport E, Paul A, McKenzie RC, et al. Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *J Biol Chem.* 2001 Aug 24;276(34):31657-66.

Kantyka T, Latendorf T, Wiedow O, Bartels J, Gläser R, Dubin G, et al. Elafin is specifically inactivated by RgpB from *Porphyromonas gingivalis* by distinct proteolytic cleavage. *Biol Chem.* 2009;390:1313-20.

Kim JA, Choi SC, Yun KJ, Kim DK, Han MK, Seo GS, Yeom JJ, Kim TH, Nah YH, Lee YM. Expression of protease-activated receptor 2 in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2003 Jul;9(4):224-9.

Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2001;25:8-20.

Kirkwood KL, Rossa C Jr. The potential of p38 MAPK inhibitors to modulate periodontal infections. *Curr Drug Metab*. 2009 Jan;10(1):55-67.

Kubinak JL, Round JL. Toll-like receptors promote mutually beneficial commensal-host interactions. *PLoS Pathog*. 2012;8(7):e1002785.

Lee KE, Kim JW, Jeong KY, Kim KE, Yong TS, Sohn MH. Regulation of German cockroach extract-induced IL-8 expression in human airway epithelial cells. *Clin Exp Allergy*. 2007; 37:1364-73.

Li Q, Valerio MS, Kirkwood KL. MAPK Usage in Periodontal Disease Progression. *J Signal Transduct*. 2012;2012:308943.

Lindner JR, Kahn ML, Coughlin SR, Sambrano GR, Schauble E, Bernstein D, et al. Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice. *J Immunol*. 2000;165:6504-10.

Liu BB, Cheng LL, Liu Dali et al. Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide-Induced VCAM-1 Expression in Human Aortic Endothelial Cells. *J Periodontol*. 2012, 83(7):955-62.

Liu J, Wang Y, Ouyang X. Beyond toll-like receptors: *Porphyromonas gingivalis* induces IL-6, IL-8, and VCAM-1 expression through NOD-mediated NF- κ B and ERK signaling pathways in periodontal fibroblasts. *Inflammation*. 2013 Apr;37(2):522-33.

Löe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol*. 1967; 38: 610-16.

Lönn J, Johansson CS, Nakka S, Palm E, Bengtsson T, Nayeri F, et al. High concentration but low biological activity of hepatocyte growth factor in patients with periodontitis. *J Periodontol*. 2014 Jan;85(1):113-22.

Lourbakos A, Chinni C, Thompson P, Potempa J, Travis J, Mackie EJ, et al. Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*. *FEBS Lett*. 1998; 435:45-8.

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*. 2001; 69:5121-5130.

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

Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000. 2007;43:41-55.

Matthews JB, Wright HJ, Roberts A, Cooper PR, Chapple IL. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin Exp Immunol.* 2007a Feb;147(2):255-64.

Matthews JB, Wright HJ, Roberts A, Ling-Mountford N, Cooper PR, Chapple IL. Neutrophil hyper-responsiveness in periodontitis. *J Dent Res.* 2007b Aug;86(8):718-22.

Moraes TJ, Martin R, Plumb JD, Vachon E, Cameron CM, Danesh A, et al. Role of PAR2 in murine pulmonary pseudomonal infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;294:368-77.

Morel F, Doussiere J, Vignais PV. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem.* 1991 Nov 1;201(3):523-46.

Moriyuki K1, Nagataki M, Sekiguchi F, Nishikawa H, Kawabata A. Signal transduction for formation/release of interleukin-8 caused by a PAR2-activating peptide in human lung epithelial cells. *Regul Pept.* 2008 Jan 10;145(1-3):42-8.

Nagaraja C, Pradeep AR. Hepatocyte growth factor levels in gingival crevicular fluid in health, disease, and after treatment. *J Periodontol.* 2007; 78:742-7.

Nickel TJ, Kabir MH, Talreja J, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Constitutive expression of functionally active protease-activated receptors 1 and 2 in human conjunctival epithelial cells. *Mediators Inflamm.* 2006;2006(3):61359.

Noguera A, Batle S, Miralles C, Iglesias J, Busquets X, MacNee W, et al. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2001 Jun;56(6):432-7.

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

Ossovsckaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.* 2004; 84:579-21.

Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000.1997 Jun;14:9-11.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.

Reynolds JJ, Meikle MC. The functional balance of metalloproteinases and inhibitors in tissue degradation: relevance to oral pathologies. *J R Coll Surg Edinb.* 1997 Jun;42(3):154-60.

Rudrakshi C, Srinivas N, Mehta DS. A comparative evaluation of hepatocyte growth factor levels in gingival crevicular fluid and saliva and its correlation with clinical parameters in patients with and without chronic periodontitis: A clinic-biochemical study. *J Indian Soc Periodontol.* 2011;15:147-51.

Sakai DK. Loss of virulence in a protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida*. *Infect Immun.* 1985 Apr;48(1):146-52.

Salonen JI, Paunio KU. An intracrevicular washing method for collection of crevicular contents. *Scand J Dent Res.* 1991; 99:406-12.

Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2006; 40:77-93.

Schmidlin F, Amadesi S, Dabbagh K, Lewis DE, Knott P, Bunnett NW et al. Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *J Immunol.* 2002;169:5315-21.

Schmidlin F, Bunnett NW. Protease-activated receptors: how proteases signal to cells. *Curr Opin Pharmacol.* 2001 Dec;1(6):575-82.

Segelnick SL, Weinberg MA. Reevaluation of initial therapy: when is the appropriate time? *J Periodontol.* 2006;77:1598-601.

Shpacovitch V, Feld M, Bunnett NW, Steinhoff M. Protease-activated receptors: novel PARTners in innate immunity. *Trends Immunol.* 2007a Dec;28(12):541-50.

Shpacovitch VM, Seeliger S, Huber-Lang M, Balkow S, Feld M, Hollenberg MD, et al. Agonists of proteinase-activated receptor-2 affect transendothelial migration and apoptosis of human neutrophils. *Exp Dermatol*. 2007b Oct;16(10):799-806.

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

Sugawara Y, Uehara A, Fujimoto Y, Kusumoto S, Fukase K, Shibata K, et al. Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. *J Dent Res*. 2006 Jun;85(6):524-9.

Sun Y, Shu R, Li CL, Zhang MZ. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 2010 Oct;81(10):1488-96.

Souza JA, Rossa C Jr, Garlet GP, Nogueira AV, Cirelli JA. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(2):128-38.

Syeda F, Grosjean J, Houliston RA, Keogh RJ, Carter TD, Paleolog E, et al. Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cells require cooperation between mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *J Biol Chem*. 2006 Apr 28;281(17):11792-804.

Tanner AC, Izard J. *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontol 2000*. 2006;42:88-113.

Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol 2000*. 2013 Jun;62(1):95-162.

Uehara A, Muramoto K, Imamura T, Nakayama K, Potempa J, Travis J, et al. 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;175:6076-84.

Uehara A, Iwashiro A, Sato T, Yokota S, Takada H. Antibodies to proteinase 3 prime human monocytic cells via protease-activated receptor-2 and NF-kappaB for Toll-like receptor- and NOD-dependent activation. *Mol Immunol*. 2007 Jul;44(14):3552-62.

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; 10:1181-9.

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

Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79:1601-8.

Vergnolle N. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J Immunol.* 1999b Nov 1;163(9):5064-9.

Vergnolle N, Hollenberg MD, Sharkey KA, Wallace JL. Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR2)-activating peptides in the rat paw. *Br J Pharmacol.* 1999a Jul;127(5):1083-90.

Vergnolle N, Bunnett NW, Sharkey KA, Brussee V, Compton SJ, Grady EF, et al. Proteinase activated receptor-2 and hyperalgesia: a novel pain pathway. *Nat Med.* 2001;7:821-6.

Vergnolle N, Wallace JL, Bunnett NW, Hollenberg MD. Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22:146-52.

Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol.* 2004 Nov;5(11):1166-74.

Walter C, Zahlten J, Schmeck B, Schaudinn C, Hippenstiel S, Frisch E, et al. *Porphyromonas gingivalis* strain-dependent activation of human endothelial cells. *Infect Immun.* 2004 Oct;72(10):5910-8.

Wara-aswapati N, Chayasadam A, Surarit R, Pitiphat W, Boch JA, Nagasawa T, et al. Induction of toll-like receptor expression by *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol.* 2013 Jul;84(7):1010-8.

Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110:21–35.

Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Feb 20;18(6):642-60.

Yin L, Swanson B, An J, Hacker BM, Silverman GA, Dale BA, et al. Differential effects of periopathogens on host protease inhibitors SLPI, elafin, SCCA1, and SCCA2. *J Oral Microbiol*. 2010. 4:1-12.

Yun LW, Decarlo AA, Hunter N. Blockade of protease-activated receptors on T cells correlates with altered proteolysis of CD27 by gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. *Clin Exp Immunol*. 2007;150:217-29.

Yoshida N, Yoshikawa T. Basic and translational research on proteinase-activated receptors: implication of proteinase/proteinase-activated receptor in gastrointestinal inflammation. *J Pharmacol Sci*. 2008 Dec;108(4):415-21.

Yoshida N, Katada K, Handa O, Takagi T, Kokura S, Naito Y, et al. Interleukin-8 production via protease-activated receptor 2 in human esophageal epithelial cells. *Int J Mol Med*. 2007 Feb;19(2):335-40.

Zeng X, Zhang S, Xu L, Yang H, He S. Activation of protease-activated receptor 2-mediated signaling by mast cell tryptase modulates cytokine production in primary cultured astrocytes. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:140812.

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

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

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

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

São Paulo, 01 de julho de 2010.

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

ANEXO B – Termo de Outorga Processo FAPESP nº 2010/20477-8

Processo: 2010/20477-8
 Data impressão: 05/08/2011 07:20:02
 Folha: _____
 Volume: _____
 Rubrica: _____

Termo de Outorga

Processo 2010/20477-8

O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada OUTORGANTE , usando das atribuições que lhe confere o Artigo 14, letra "b" da lei Estadual no 5.918, de 18 de outubro de 1960, e de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que são parte integrante deste Termo, concede:	
Outorgado	Vanessa Tubero Euzebio Alves
Orientador/Supervisor	Marinella Holzhausen
Instituição	Faculdade de Odontologia/FO/USP
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Doutorado
Projeto	Avaliação da expressão do receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR-2) em pacientes com periodontite crônica, antes e após tratamento periodontal não-cirúrgico.
Grande Área	Ciências da Saúde
Área	Odontologia
Sub-área	Periodontia
Vigência	01/08/2011 a 31/07/2013
Relatórios Científicos até	10/07/2012,10/08/2013
Ata de Defesa até	15/11/2013

Observações
- Havendo solicitação de renovação da bolsa, a entrega do último relatório científico deverá ser antecipada em dois meses. A não observância deste prazo poderá acarretar a descontinuidade no pagamento da bolsa, caso a concessão seja renovada.

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

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

TÍTULO: “EXPRESSÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS POR PROTEASE (PARs) EM PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA”.

RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Marinella Holzhausen.

JUSTIFICATIVA: A doença periodontal (gengival) é uma inflamação que deixa a gengiva inchada, vermelha e, em alguns casos, pode causar o amolecimento e perda do dente. Essa é uma doença muito comum, pois oito em cada dez adultos brasileiros apresentam alguma forma de doença da gengiva. A inflamação da gengiva é causada por bactérias (germes) da boca que vivem ao redor dos dentes e gengiva. Estas bactérias produzem algumas substâncias que, de alguma forma, irritam a gengiva. O objetivo desse estudo é avaliar se a irritação da gengiva acontece por causa da união das substâncias produzidas pelas bactérias da boca com uma proteína da gengiva chamada receptor tipo 2 ativado por protease. Neste estudo serão examinados pacientes adultos, entre 20 e 65 anos de idade, para saber se apresentam doença da gengiva. Também será avaliado se estes pacientes têm na boca uma proteína chamada receptor tipo 2 ativado por protease. Todos os dentes serão examinados e será coletado um pouco de líquido da gengiva com uma cone de papel e uso de solução salina. O exame leva aproximadamente 20 minutos, não dói e não causa qualquer problema para a pessoa. Se o paciente não quiser participar deste estudo será feito apenas um exame mais rápido para ver que tipo de tratamento dentário a pessoa precisa. Se o senhor (a) quiser participar, mas durante o exame não gostar de alguma coisa é só falar com o dentista que ele irá parar na mesma hora. O tratamento dentário será realizado mesmo que o senhor (a) não queira participar do trabalho.

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

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

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

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

Em qualquer etapa do estudo, o Sr.(a) poderá contatar os profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal pesquisador é a Profa. Dra. Marinella Holzhausen que pode ser encontrada na Faculdade de Odontologia da USP, localizada na Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária, (11) 3091-7833. Se o Sr.(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, poderá entrar em contato com o comitê de ética em pesquisa da FOU SP: Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária.

DECLARAÇÃO

Eu,.....

Nacionalidade.....,

Estado civil.....

Profissão....., nascido (a) em / /

Na cidade de....., estado de.....

Portador da cédula de identidade

Número.....

CPF.....,

Residente a.....

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

Assinatura do paciente

Assinatura do responsável

São Paulo, _____ de _____ 201__.

ANEXO D - Ficha de anamnese

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

ANEXO E - Ficha de exame clínico (Periograma, IG e IP)

Modelo de ficha clínica (Periograma) para registro de medidas de profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção (NCI) e sangramento à sondagem (SS):

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA
DISCIPLINAS DE PERIODONTIA

PACIENTE: _____ Nº: _____
 IDADE: _____ SEXO: _____ RAÇA: _____ DATA DO EXAME: ____/____/____

FICHA INICIAL () REAVALIAÇÃO () FINAL ()

UEC – MG PCS – SS NCI				VESTIBULAR

UEC – MG PCS – SS NCI				PALATINA

UEC – MG PCS – SS NCI				LINGUAL

UEC – MG PCS – SS NCI				VESTIBULAR

Índice de Sangramento: ____%

PSR

Modelo de ficha clínica para registro do índice de gengival (IG):

ÍNDICE GENGIVAL

INICIAL

Data:

Maxila

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

Mandibula

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

FINAL

Data:

Maxila

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

Mandibula

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

n DENTES AUSENTES

SUPERE

IG INICIAL

#DIV/O!

IG FINAL

#DIV/O!

IGF/IGI

#DIV/O!

% de Red.

#DIV/O!

Modelo de ficha clínica para registro do índice de placa (IP)

ÍNDICE DE PLACA

INICIAL

Data:

Maxila

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

Mandíbula

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

FINAL

FINAL

Data:

Maxila

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

Mandíbula

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

n DENTES AUSENTES

SUPERE

IP INICIAL

#DIV/O!

IP FINAL

#DIV/O!

IPF/IPI

#DIV/O!

% de Red.

#DIV/O!

ANEXO F - Termo de Outorga Processo FAPESP nº 2012/22439-1

Processo: 2012/22439-1
 Data impressão: 06/02/2013 13:16:14
 Folha: _____
 Volume: _____
 Rubrica: _____

Termo de Outorga

Processo 2012/22439-1

O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada OUTORGANTE , usando das atribuições que lhe confere o Artigo 14, letra "b" da lei Estadual no 5.918, de 18 de outubro de 1960, e de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que são parte integrante desde Termo, concede:	
OUTORGADO	Vanessa Tubero Euzebio Alves
Orientador/Supervisor	Marinella Holzhausen
Instituição	Faculdade de Odontologia/FO/USP
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No Exterior / Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior / BEPE - Doutorado
Projeto	Papel da via de sinalização MAPK p38 associada à ativação do PAR2 em células periodontais após infecção por Porphyromonas gingivalis
Área	Odontologia
Grande Área	Ciências da Saúde
Sub-área	Periodontia
Vigência	20/02/2013 a 19/02/2014
Relatórios Científicos até	30/03/2014
Prestação de Contas até	30/03/2014

ANEXO G - Parecer do Institutional Review Board - The Forsyth Institute

Institutional Review Board

FWA # 00000398
IRB #00000037

Forsyth

The Forsyth Institute
245 First Street
Cambridge, MA 02142
www.forsyth.org

DATE: February 10, 2014

TO: Alpdogan Kantarci, DDS, PhD
FROM: Debra Rider, IRB Administrator
STUDY TITLE: Hypoxia and PMN function in periodontitis; IRB# 11-06
SUBMISSION TYPE: Continuation
REVIEW TYPE: Expedited
REVIEW CATEGORY: 45 CFR 46.110
ACTION: Unconditional Approval
APPROVAL DATE: February 12, 2014
EXPIRATION DATE: February 11, 2015

Thank you for your Annual Status Report (ASR) submission for this study. The Forsyth IRB (FIRB) has reviewed and APPROVED your submission. This submission qualified for expedited review based on the risk level of the project as determined by federal regulations. The FIRB considers the following criteria when reviewing all research submissions: (i) the risks and anticipated benefits, if any to subjects; (ii) the equitable selection of subjects; (iii) the procedures for securing and documenting informed consent; (iv) the safety of subjects; and (v) the privacy of subjects and confidentiality of the data.

You will have to report all plans to make changes to the project to the FIRB by submitting an amendment form prior to implementation. Only IRB approved forms: consent forms, questionnaires/surveys, advertisements, letters, etc. may be used.

You must submit any Serious Adverse Events (SAE) to the IRB within 24 hours of knowledge of the event and Adverse Events (AE) within 2 weeks. Please use the appropriate form to report any unanticipated event. FIRB will report problems and changes in protocol to Institutional, State, or Federal authorities, as necessary. The FIRB has the authority to terminate projects that cause unexpected serious harm or are not in compliance with approval requirements.

Approved Documents:

1. IRB letter for continuation

Please retain this letter for your records. Research records should be kept for a minimum of three years after the completion of the study. Direct any questions to the IRB Administrator @ 617-892-8402.

cc: MaryAnn Cugini, Forsyth IRB Chair