



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



PAULO CIRINO DE CARVALHO FILHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Expressão das Proteínas Fas e Bcl-2 sob Estímulo da Proteína
Recombinante HmuY de *Porphyromonas gingivalis* em
Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP) de
Indivíduos Portadores de Periodontite Crônica**

SALVADOR - BAHIA

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Expressão das Proteínas Fas e Bcl-2 sob Estímulo da Proteína Recombinante HmuY de *Porphyromonas gingivalis* em Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP) de Indivíduos Portadores de Periodontite Crônica

PAULO CIRINO DE CARVALHO FILHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Imunologia.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Roberto José Meyer do Nascimento

CO-ORIENTADORA:

Prof. Dra. Márcia Tosta Xavier

SALVADOR - BAHIA

2011

Sistema de Bibliotecas da UFBA

Carvalho Filho, Paulo Cirino de.
Expressão das proteínas Fas e Bcl-2 sob estímulo da proteína recombinante HmuY de *Porphyromonas gingivalis* em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de indivíduos portadores de periodontite crônica / Paulo Cirino de Carvalho Filho. - 2011.
52 f. : il.

Inclui anexo e apêndices.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer do Nascimento.

Co-orientadora: Profª. Drª. Márcia Tosta Xavier.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2011.

1. Periodontite. 2. Porphyromonas gingivalis. I. Nascimento, Roberto José Meyer do. II. Xavier, Márcia Tosta. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD - 617.632
CDU - 616.311.2-002



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



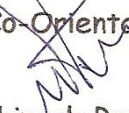
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DO MESTRANDO
PAULO CIRINO DE CARVALHO FILHO


Aos vinte dias do mês de abril do ano de dois mil e onze às nove e trinta horas, no auditório Ophélia Gaudenzi, 3º andar do Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, se reúne a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dr. Roberto José Meyer Nascimento orientador, Dra. Márcia Tosta Xavier Co-Orientadora, Dr. Urbino da Rocha Tunes, Dra. Lília Ferreira de Moura Costa com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado: "Expressão das Proteínas Fas e Bcl-2 sob Estímulos da Proteína Recombinante HmuY de *Porphyromonas gingivalis* em Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP) de Indivíduos Portadores de Periodontite Crônica" do Mestrando PAULO CIRINO DE CARVALHO FILHO. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que o pós-graduando teve a sua defesa de Dissertação aprovada, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerra-se a sessão, da qual é lavrado a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pelo Mestrando e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação. Salvador, 20 de abril de 2011.



Dr. Roberto José Meyer Nascimento
Orientador


Dra. Lília Ferreira de Moura Costa
Banca Examinadora


Dra. Márcia Tosta Xavier
Co-Orientadora


Dr. Urbino da Rocha Tunes
Banca Examinadora


Paulo Cirino de Carvalho Filho
Mestrando


Dra. Silvia Lima Costa
Vice-Coordenadora do PPGIm

"Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer!" (Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os desafios superados e pelas grandes vitórias na vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Meyer, por quem tenho muito respeito e admiração, pelo empenho na idealização e realização desse trabalho.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Márcia Tosta, por toda a dedicação, inteligência e extrema competência no desenvolvimento desse trabalho, sempre muito atenta e exigente, estimulando brilhantemente o meu desenvolvimento científico.

À Prof^a Dr^a Soraya C. Trindade, por ser uma pessoa muito especial, contribuindo muito para minha formação profissional desde a minha graduação, transmitindo sabiamente seus ensinamentos.

À minha mãe, Inês, que sempre me apoiou em todas as minhas atitudes. E ao meu pai, Paulo (*in memoriam*), que estaria certamente muito orgulhoso dessa minha evolução profissional.

À minha noiva, Lílian Rodrigues, sempre presente na minha vida, mesmo nas ausências, me encorajando na superação dos desafios.

Aos meus irmãos, Claudio, Carlos e Marcos e às minhas irmãs Rosa, Glória, Eliane, Luciana e Eneida, que sempre me apoiaram e me ajudaram nos momentos mais difíceis e orgulharam-se das grandes vitórias.

Ao meu cunhado, Wilson (*in memoriam*) e meu sobrinho Lucas (*in memorian*), pelo exemplo de vida e alegria de viver, sempre presentes em meu coração.

A Prof^a Dr^a Vera Vale, que me acolheu no laboratório de Imunologia.

A Bianca, nossa estagiária, por toda ajuda e empenho na realização do trabalho.

Aos colegas do Labimuno, Geraldo, Paty Cisneiros, Rosa, Marcos, Marcela, Milton, Heide, Itala, Andréia, Rejane, Clécia, Eliane, Tadeu, pela pronta ajuda sempre que precisei.

Aos funcionários do Labimuno, Chica, Zé, Regi, Manoel, Lí, Mário, Beregedê, pelo carinho.

Ao professores e funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia e aos funcionários do CEO – Carlos Gomes, que me acolheram de braços abertos.

À professora Teresa Olczak, que disponibilizou a proteína recombinante e tornou-se uma parceira importante e respeitada.

RESUMO

CARVALHO-FILHO, P.C. Expressão das Proteínas Fas e Bcl-2 sob Estímulo da Proteína Recombinante HmuY de *Porphyromonas gingivalis* em Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP) de Indivíduos Portadores de Periodontite Crônica. 2011. 52f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador, 2011.

A periodontite é uma doença multifatorial causada pela resposta imuno-inflamatória do hospedeiro sob estímulos bacterianos que destroem o periodonto. Este estudo objetivou investigar a expressão *in vitro* das proteínas Fas e Bcl-2 em Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP) estimuladas pela proteína rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* (Pg). Os 39 voluntários (18-periodontite crônica-PC e 21-sem periodontite-SP) foram avaliados seguindo descritores clínicos periodontais. As CMSP foram cultivadas sob o estímulo de *P. gingivalis* e os ensaios para a expressão de Bcl-2 e Fas (CD95) foram realizados após 48 horas. A fluorescência para CMSP com os marcadores para CD3, CD4, CD8, Bcl-2 e CD95 foi determinada usando Citometria de Fluxo. A expressão de Bcl-2 em células T CD3⁺ de indivíduos com PC estimuladas com a proteína rHmuY foi maior do que nos SP (P=0,043) e também maior do que nas CMSP estimuladas com o extrato total de *Pg ATCC 33277* e sem estímulo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na co-expressão dos marcadores para CD3/CD4, CD3/CD8, Fas/Bcl-2 e CD3/Fas nas CMSP. A proteína rHmuY pode representar um importante estímulo de *P. gingivalis*, induzindo expressão elevada de Bcl-2, a qual possibilita a inibição de apoptose em CMSP de indivíduos com periodontite crônica.

PALAVRAS-CHAVE: *Porphyromonas gingivalis*, *Periodontite crônica*, *rHmuY*, *Bcl-2*, *Fas*, *Apoptose*.

ABSTRACT

CARVALHO-FILHO, P.C. Fas and Bcl-2 protein expression under stimuli of recombinant HmuY protein of *Porphyromonas gingivalis* in peripheral blood mononuclear Cells (PBMC) in Individuals with chronic periodontitis. 2011. 52f. Dissertation (Master's degree in immunology) – Institute of Health Sciences, UFBA, Salvador, 2011.

Periodontitis is a multifactorial disease caused by host immune-inflammatory response against bacterial aggression that destroys the periodonto structure. In this study, *in vitro* expression of Fas and Bcl-2 proteins in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) was investigated under stimuli by rHmuY *Porphyromonas gingivalis* protein. 39 volunteers (18-Chronic Periodontitis-CP e 21-No Periodontitis - NP) were evaluated by clinical periodontal descriptors. The PBMCs were cultivated under *P. gingivalis* antigens stimuli and Bcl-2 and Fas expression were evaluated after 48 hours. The florescence for PBMC with markers to CD3, CD4, CD8, Bcl-2 e CD95 was determinate using flow cytometry. The Bcl-2 expression in T CD3⁺ cells of individuals with CP stimulated with rHmuY protein was higher than NP (P=0,043). Similar results were observed in PBMC stimulated with total extract from *Pg ATCC 33277* and in no stimulated cells. No statistical differences were observed when co-expressions of CD3/CD4, CD3/CD8, Fas/Bcl-2 and CD3/Fas were analyzed in PBMC. rHmuY could be an important stimuli from *P. gingivalis* inducing Bcl-2 elevated expression which could inhibit apoptosis in PBMC of individuals with chronic periodontitis.

KEY-WORD: *Porphyromonas gingivalis*, *Chronic periodontitis*, *rHmuY*, *Bcl-2*, *Fas*, *Apoptosis*.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Aa	<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AAP	Academia Americana de Periodontia
APAF-1	“Apoptotic protease-activating factor-1” ou protease ativadora do fator 1 da apoptose
ATCC	“American Type Culture Collection” – Banco de Coleção de Culturas Americanas
Bak	Proteína da família Bcl-2 – Pró-apoptótica
Bax	Bcl-2 associada à proteína X – Pró-apoptótica
Bcl-2	Células B / linfoma-2 - Proteína intra-citoplasmática que inibe a apoptose – Anti-apoptótica
BH3	Domínio de homologia à Bcl-2
Bid	Domínio de interação / BCL-2 – Pró-apoptótica
Bim	Proteína da família Bcl-2 produzida pelo gene bim – Pró-apoptótica
BSA	Albumina Sérica Bovina
CD	“Cluster of Differentiation” – Diferenciação de Grupo
Cy5	Fluorocromo de cor vermelha
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Fas/CD95/APO-1	Receptor ou proteína de membrana pró-apoptose
FITC	Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
H ₂ O ₂	Água oxigenada
HCl	Ácido Clorídrico

High-MW	“High Molecular Weigth” – Alto peso molecular
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-11	Interleucina 11
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
kDa	Quilodalton
KgP	Gingipaína K
Low-MW	“Low-Molecular Weigth” – Baixo peso molecular
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Linfócito T
LTA	Ácido lipoteicóico
NFkB	Fator nuclear ativador da cadeia leve kappa de células B ativadas
Nm	Nanômetro
PC	Periodontite Crônica
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
RgP	Gingipaína R
RNA	Ácido ribonucléico
SP	Sem Periodontite
SPSS	“Statistical Package for Social Sciences” – Programa Estatístico para Ciências Sociais
STF	Salina Tamponada com Fosfato

TCR	Receptor de linfócitos T
Td	<i>Treponema denticola</i>
Tf	<i>Tannerella forshytensis / Tannerella forsythia</i>
TGF- β	Fator Transformador de Crescimento - β
Th1	Resposta imune celular com perfil 1
Th17	Resposta imune celular com perfil 17
Th2	Resposta imune celular com perfil 2
TLR	“Toll-like receptor” – Receptor tipo Toll
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFR	Receptor de TNF
TRAIL	“TNF-related apoptosis inducing ligand” – ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
Treg	Resposta imune celular com perfil regulatório

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	13
1.1	IMUNOPATOGÊNESE DA PERIODONTITE CRÔNICA	13
1.2	MOLÉCULAS IMUNODETERMINANTES DE <i>Porphyromonas gingivalis</i>	16
1.3	PERIODONTITE CRÔNICA E MORTE CELULAR	19
2.0	Hipóteses	22
3.0	Objetivos	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4.0	Resultados	24
4.1	MANUSCRITO: <i>Expressão das Proteínas Fas e Bcl-2 sob Estímulo da Proteína Recombinante HmuY de Porphyromonas gingivalis em Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP) de Indivíduos Portadores de Periodontite Crônica</i>	24
5.0	Discussão	30
6.0	Conclusão	31
	Referências	35
	Anexo e Apêndices	46
	ANEXO 1.....	46
	APÊNDICE 1.....	47
	APÊNDICE 2.....	48
	APÊNDICE 3.....	50

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 IMUNOPATOGÊNESE DA PERIODONTITE CRÔNICA

A periodontite crônica pode ser descrita como uma série de alterações patológicas que ocorrem nos tecidos periodontais resultantes de uma resposta inflamatória à agressão de periodontopatógenos presentes no biofilme dental, podendo afetar somente a gengiva ou progredir para o periodonto de sustentação, levando à mobilidade e posterior perda das unidades dentárias acometidas pelo processo patológico (GEMMEL; SEYMOUR, 2004). Clinicamente observa-se na periodontite: reabsorção do osso alveolar, perda de inserção clínica, presença de bolsa periodontal e inflamação gengival (ARMITAGE, 1999).

Os principais agentes etiológicos bacterianos associados com a Periodontite são: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forshytensis* (SOCRANSKY *et al.*, 1998). Reconhece-se que apenas a presença de bactérias patogênicas não é suficiente para causar a doença. O conceito atual de etiologia multifatorial das doenças periodontais inclui o hospedeiro como componente fundamental (Figura 1).

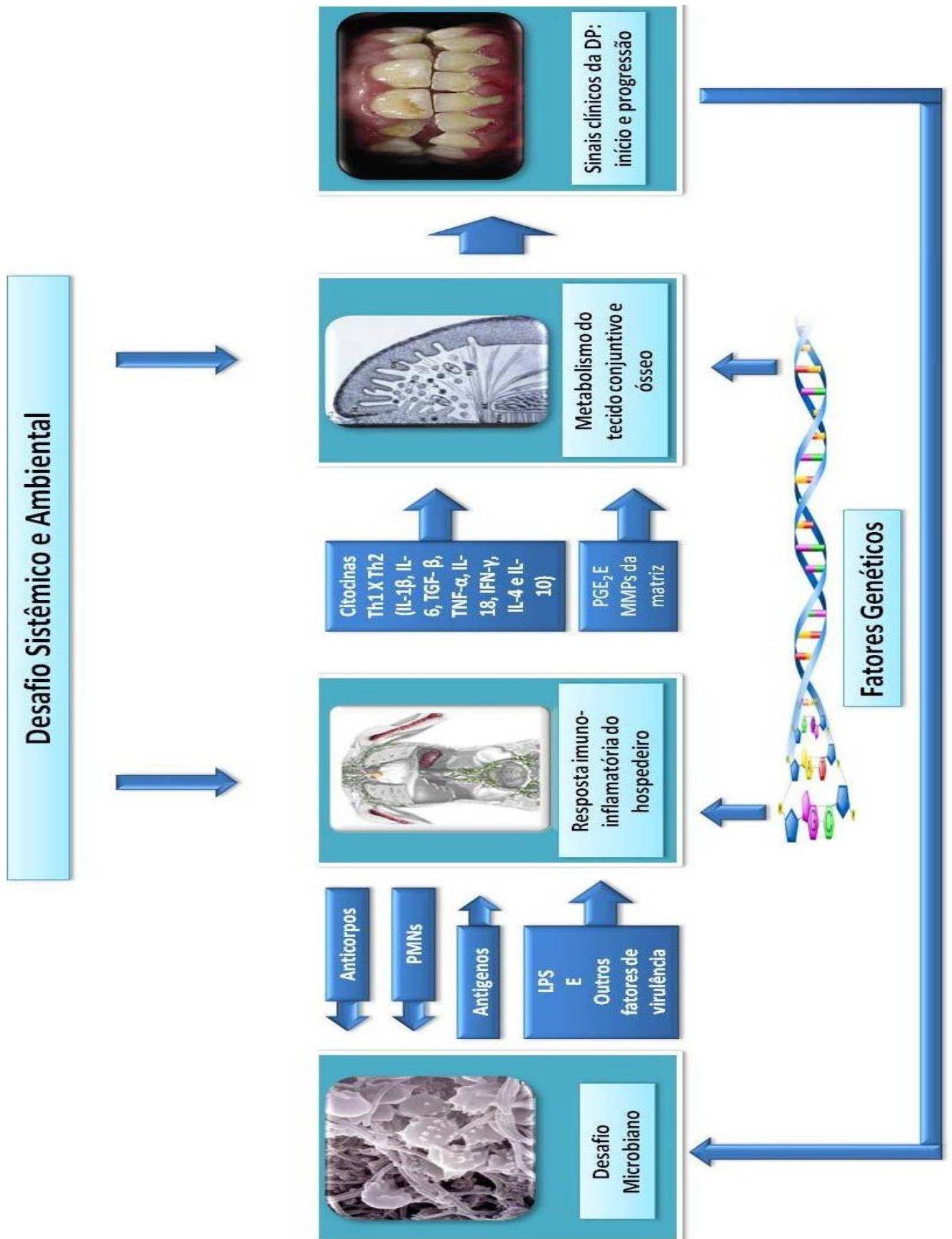


Figura 1: Diagrama do modelo teórico para a imunomodulação frente a estímulos de periodontopatógenos e a patogênese da doença periodontal. Adaptado de Page e Kornman, 1997.

Os periodontopatógenos promovem o recrutamento e ativação de células do hospedeiro, como monócitos/macrófagos, linfócitos, fibroblastos e outros tipos celulares, induzindo o desequilíbrio na produção de mediadores inflamatórios e suas moléculas contra-regulatórias. Inúmeros estudos têm demonstrado a liberação de quimiocinas (GRAVES *et al.*, 2008; DEZEREGA *et al.*, 2010), citocinas (SAKAI *et al.*, 2006; VARDAR-SENGUL *et al.*, 2009) e imunoglobulinas (OFFENBACKER *et al.*, 2007; DYE *et al.*, 2009) em resposta à exposição a componentes bacterianos.

Componentes de *Porphyromonas gingivalis* modulam a resposta imune do hospedeiro por meio de indução de apoptose de linfócitos T e macrófagos. Estas estruturas moleculares de *P. gingivalis* promovem uma resposta de citocinas pró-inflamatórias que parecem exercer um papel importante na patogenia de várias formas de doença periodontal. Os efeitos das estruturas moleculares da bactéria, em especial o LPS bacteriano, podem estimular a liberação dessas citocinas, que além de intensificar a resposta inflamatória, aumentam a produção de metaloproteinases de matriz, resultando na degradação do tecido conjuntivo e reabsorção do osso alveolar (LINDHE, 1999).

Estão presentes nos sítios com inflamação periodontal os linfócitos T do tipo Th1 e Th2 e sua associação com citocinas com uma subsequente polarização Th1. As células T do tipo Th1 regulam a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α , que podem induzir a reabsorção óssea indiretamente por promover a diferenciação de precursores de osteoclastos e a sua subsequente ativação (JOHNSON e SERIO, 2005; TAUBMAN e KAWAI, 2001).

Os linfócitos T também secretam citocinas pró-reabsortivas, como por exemplo, IL-1, IL-6 e IL-17, e cada uma estimula o receptor ativador do ligante de NF κ B (RANKL) expresso em osteoblastos e fibroblastos, permitindo a formação osteoclástica por um processo dependente de contato. Notadamente, a produção de IL-17 descrita em populações de células T CD4+, com a produção celular designada de Th17, expressando TNF, IL-6 e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), são respondedores a IL-23, que por sua vez, irá regular a sua expansão e sobrevivência (GILLESPIE, 2007).

O microambiente da lesão periodontal também pode conter IL-10 que tem efeito em vários tipos celulares, incluindo células T, células B, macrófagos, células NK, mastócitos e neutrófilos. Estes efeitos incluem uma modulação negativa da produção de

IL-1, IL-8, IL-12 e TNF- α , e inibição da fagocitose (MURRAY, D. A.; WILTON, J.M.A, 2003).

Normalmente, o repertório de células T contém linfócitos T regulatórios CD4+ CD25+ que controlam as respostas imunes auto-reativas na periferia (KAWAHATA *et al*, 2002). A população de células T regulatórias CD4+ CD25+ e possivelmente outras células T regulatórias são encontradas na doença periodontal e mostraram-se mais elevadas na periodontite quando comparadas com a gengivite (NAKAJIMA *et al*, 2005).

As células T regulatórias são responsáveis pelos mecanismos de tolerância e a função supressiva de células T CD4+ CD25+ mostrou ser em parte dependente do contato celular, sugerindo que a mucosa humana induz tolerância a diversos antígenos (KARLSSON *et al*, 2004).

1.2 MOLÉCULAS IMUNODETERMINANTES DE *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis, é um bacilo Gram-negativo (G-) anaeróbio estrito, da família *Bacteroidacea*, de grande importância como agente etiológico da doença periodontal, principalmente em coinfeção com outras bactérias. Existem mais de 700 espécies bacterianas distintas identificadas na cavidade bucal, porém os estudos de Haffajee e Socransky (1998) relatam quatro espécies com maior evidência etiológica na doença periodontal destrutiva: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forshytensis*. *P. gingivalis* possui uma variedade de fatores de virulência tais como proteínas da cápsula, lipopolissacarídeo (LPS), fímbrias e proteínas da membrana externa, como as gingipainas ligadas e secretadas, podendo determinar uma grande imunogenicidade, ao estimular tanto a resposta imune humoral quanto a resposta imune celular do hospedeiro.

Gingipainas são proteases semelhantes à tripsina cisteína produzidas por *Porphyromonas gingivalis*. As atividades de virulência de várias gingipainas contam com mecanismos de ativação e inativação de proteínas do hospedeiro, estimulando a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) em fibroblastos. As MMPs secretadas podem destruir os tecidos periodontais, degradando citocinas, componentes do sistema complemento e vários receptores, incluindo o CD14 em macrófagos, células T CD4 e

CD8, perturbando os sistemas de defesa do hospedeiro, e assim facilitando a colonização por *P. gingivalis* (IMMAMURA, T.; TRAVIS, J.; POTEMPA, J., 2003).

Foi demonstrado que *P. gingivalis* possui a capacidade de invadir células epiteliais (NJOROGE *et al.*, 1997), o que pode ser um mecanismo de escape contra as defesas do hospedeiro, favorecendo a penetração do microrganismo na corrente sanguínea e assim atuando sistemicamente em seu organismo (WALTER *et al.*, 2004)

O LPS de *Porphyromonas gingivalis* é estruturalmente diferente do LPS das outras bactérias Gram negativas, possuindo também diferentes propriedades imunogênicas. É reconhecido pelas células inatas do hospedeiro pelo *Toll-like receptor* (TLR)-2 (HIRSCHFELD *et al.*, 2001; COATS *et al.*, 2003), podendo interagir com o TLR-2 e o TLR-6 (UNDERHILL; TIETZE *et al.*, 2006). Este incomum padrão de reconhecimento depende da heterogeneidade estrutural do lipídio A (DARVEAU *et al.*, 2004), que possibilitaria ligação tanto ao TLR-2 quanto ao TLR-4 em associação ao CD14. Além disso, uma lipoproteína associada ao LPS de *Porphyromonas gingivalis* (PG1828) identificada por Asai *et al.* (2005), parece estar extremamente envolvida na sinalização pelo TLR-2, e a remoção desse LPS pode reduzir acentuadamente o reconhecimento de *Porphyromonas gingivalis* por esta via.

A capacidade de *Porphyromonas gingivalis* evadir a resposta imunológica do hospedeiro e captar nutrientes no microambiente é diretamente relacionada com sua sobrevivência, proliferação e infecção, sendo o ferro um dos nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento, e este componente, na forma de hemina, encontra-se em maior abundância no hospedeiro (OLCZAK *et al.* 2005), que é um co-fator para o estoque de oxigênio, transporte de elétrons e bioquímica de oxirredução, essenciais para a sobrevivência da bactéria (WOJTOWICZ *et al.*, 2009). Destarte, *Porphyromonas gingivalis* possui mecanismos especiais que a capacitam a remover hemina de proteínas como a hemoglobina ligada à haptoglobina e hemina complexada à hemopexina (BRAMANTI; HOLT, 1993), utilizando a transferrina do soro e a lactoferrina localizada nas superfícies das mucosas para o seu crescimento (GENCO; ODUSANYA; BROWN, 1994; GENCO *et al.*, 1995).

Na aquisição de ferro e hemina, *Porphyromonas gingivalis* faz uso de hemaglutininas, proteases (principalmente gingipaínas), lipoproteínas e receptores específicos da membrana externa (NELSON *et al.*, 2003; POTEMPA *et al.*, 2003; OLCZAK *et al.*, 2005).

A caracterização de um gene estrutural para um novo receptor de membrana externa dependente de TonB (HmuR), necessário para a captura e utilização de hemoglobina e hemina por *P.gingivalis*, foi relatada por Simpson, Olczak e Genco (2000). Sua inativação resultou na diminuição da capacidade da bactéria em ligar hemoglobina e crescer em um ambiente com hemoglobina ou hemina como única fonte de ferro (SIMPSON; OLCZAK; GENCO, 2000, 2004; OLCZAK; DIXON; GENCO, 2001; LEWIS *et al.*, 2006; OLCZAK; SIUDEJA; OLCZAK, 2006). O gene *hmuR* está localizado em um operon com um gene *hmuY* nas cepas de *Porphyromonas gingivalis* A7436 (SIMPSON; OLCZAK; GENCO, 2000) e W83 (LEWIS *et al.*, 2006).

No entanto, pouco se sabe sobre os receptores específicos de *Porphyromonas gingivalis* para a captação e transporte da hemina para o interior da célula. Estudos têm demonstrado que gingipaínas específicas para lisina e arginina (Kgp e Rgp, respectivamente) podem ligar-se e, subsequentemente, clivar hemoglobina (IMAMURA, 2003), promovendo a degradação da trombomodulina vascular endotelial (INOMATA *et al.*, 2009).

HmuY é um peptídeo de 24 kDa ligante de hemina associado à membrana. Pode estar funcional sob a forma de dímeros ou oligômeros e a sua estrutura amino-terminal (OLCZAK *et al.*, 2008) é idêntica ao Fator Ativador de Fibroblastos (FAF), anteriormente identificado nas cepas de *Porphyromonas gingivalis* W50, W83 e ATCC33277 (MIHARA; YONEDA; HOLT, 1993a,b), que exerce uma fraca atividade fosfatase, podendo estar envolvida na reabsorção óssea, além de induzir proliferação de fibroblastos e ser funcionalmente similar com outros fatores de crescimento humanos. De acordo com Olczak *et al.* (2008), HmuY pode ser o primeiro membro relatado de uma classe de proteínas em *Porphyromonas gingivalis* e espécies de *Bacteroides* envolvidas na utilização de hemina, cuja função é seqüestrá-la e entregá-la ao seu transportador de membrana cognato, o HmuR (OLCZAK; SIUDEJA; OLCZAK, 2006; WÓJTOWICZ *et al.*, 2009). Tanto HmuY quanto HmuR parecem ser essenciais para o crescimento e sobrevivência de *Porphyromonas gingivalis*, uma vez que mutantes da cepa A7436 denominados T01 (com deleção no gene *hmuY* e inserção do gene *tetQ*, que confere resistência à tetraciclina), T02 (com deleção dos genes *hmuY* e *hmuR* e inserção dos genes *tetQ* e *ermF*, que confere resistência à eritromicina), T03 e T04 (com deleção *in-frame* de uma região interna do gene *hmuY* de 300pb e inserção do gene *ermF* nas posições senso e anti-senso), respectivamente apresentaram defeitos no crescimento quando hemina e hemoglobina foram utilizadas como fonte única de ferro (OLCZAK *et*

al. 2008). O papel da proteína HmuY na estimulação da resposta imune ainda não está bem estabelecido, apesar de seu potencial de virulência.

1.3 PERIODONTITE CRÔNICA E MORTE CELULAR

A morte celular pode ser discutida e caracterizada em dois aspectos principais: apoptose e necrose. A apoptose pode ser descrita como um processo autônomo, ativo e programado de morte celular que não induz inflamação; já a necrose pode ser entendida como uma morte celular passiva, acidental, podendo resultar de estímulos ambientais, com liberação descontrolada de conteúdos celulares inflamatórios (FINK; COOKSON, 2005). No entanto, podem ser classificados outros tipos de morte celular, podendo ou não resultar em liberação de conteúdo inflamatório. Os quatro tipos mais descritos incluem: apoptose, autofagia, oncoses e piroptose. Apoptose é a via de morte celular iniciada pelas caspases iniciadoras, que ativam as caspases efetoras para clivarem substratos celulares (SAMALI *et al.*, 1999).

As células apoptóticas apresentam condensação citoplasmática e nuclear (KERR; WYLLIE; CURRIET, 1972), dano no DNA, formação de corpos apoptóticos, manutenção da membrana plasmática intacta, porém com exposição de moléculas de superfície para a fagocitose dos corpos apoptóticos intactos (LAUBER *et al.*, 2003; SAVILL; FADOK, 2003). Uma destas moléculas é a fosfatidilserina (MARTIN *et al.*, 1996), que é encontrada no interior da membrana plasmática e que no curso da apoptose, pode ser exposta na superfície da célula, podendo ser usada como ferramenta na avaliação de morte celular, devido à sua afinidade com a anexina V (VAN ENGELAND *et al.*, 1998). Na ausência de fagocitose, os corpos apoptóticos podem se romper, levando a apoptose tardia ou necrose apoptótica.

A apoptose pode ser induzida por receptores de superfície celular, tais como Fas e receptores do factor de necrose tumoral-1 (TNFR1) (via extrínseca) ou por vários agentes genotóxicos, insultos metabólicos ou sequências transcricionais (via intrínseca). A via intrínseca começa com a indução de proteínas que apresentam apenas o domínio BH3 ou com ativação pós-translacional, o que resulta na inativação de alguns membros da família Bcl-2, promovendo a ativação de Bax e Bak, que por sua vez, promove a apoptose. Algumas proteínas BH3, como Bim e Puma, também podem ser capazes de ativar Bax e / ou Bak. Uma vez ativadas, Bax e Bak promovem a liberação do Citocromo c e provocam a fissão mitocondrial, que leva à ativação de APAF1 no apoptossomo, ativando a caspase-9 para ativar a caspase-3. Caspases, por sua vez

clivam uma série de substratos, ativando DNases e orquestrando a destruição da célula. A via extrínseca pode ignorar a etapa mitocondrial e ativar diretamente a caspase-8, que leva à ativação da caspase-3 e destruição celular. A família Bcl-2 regula a via intrínseca e pode modular a via extrínseca quando a clivagem do BID se comunica entre as duas vias (Youle RJ; Strasser, 2008) (Figura 2)

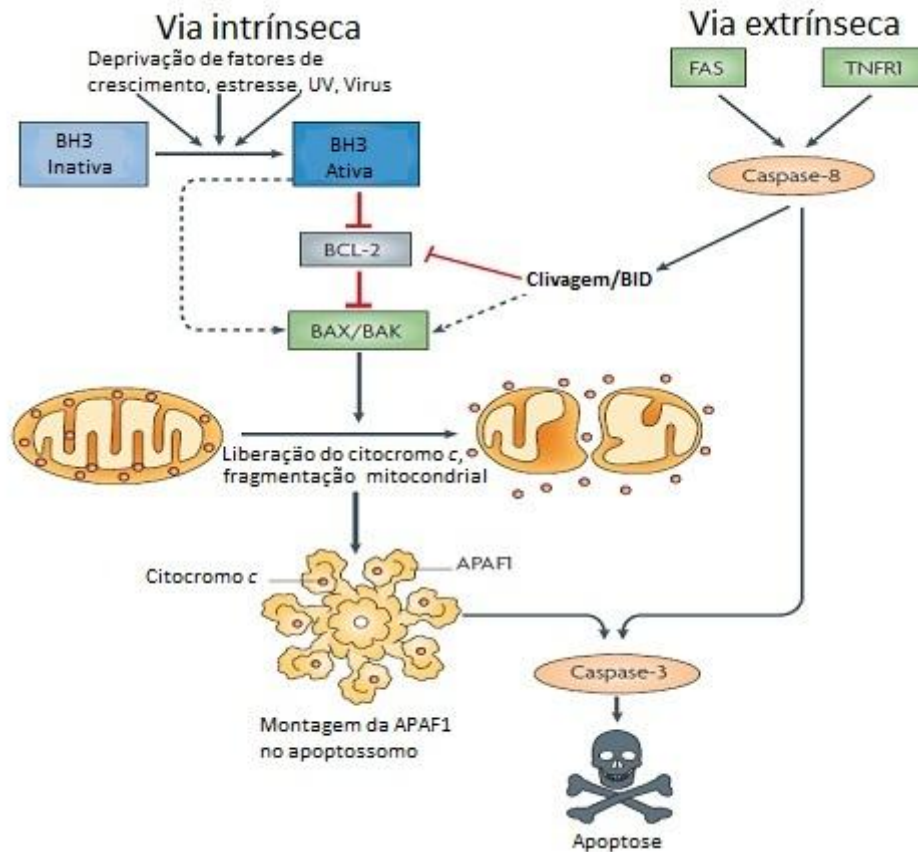


Figura 2: Esquema representando as vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose. YOULE; STRASSER, 2008.

Estudos têm demonstrado diversos fatores de supressão ou de inibição de apoptose, demonstrando a dependência de genes que codificam proteínas anti e pró-apoptóticas no equilíbrio desse processo (URNOWEY *et al.*, 2006). Pode-se observar danos no DNA associados a apoptose e expressão de p53 e Bcl-2 (TONETTI; CORTELINNI; LANG, 1998), Fas, Fas ligante e caspase-3 ativa em tecidos gengivais, quando há um desafio crônico bacteriano (BASCONES *et al.*, 2004). Segundo Brozovic *et al.* (2006), pode ser observada a indução de apoptose por *P. gingivalis* em células epiteliais gengivais humanas pelo aumento da expressão de FasL e da transcrição de genes mediada pelo fator nuclear ativador da cadeia leve kappa de células B ativadas (NFkB). Gingipaínas de *Porphyromonas gingivalis* podem induzir apoptose tanto pela

via dependente (URNOWEY *et al.*, 2006) quanto pela via independente de caspase (SHEETS *et al.*, 2006). A presença de apoptose em células T específicas para *Porphyromonas gingivalis* foi observada por Gemmell *et al.* (1999), com a constatação morfológica de condensação e marginação nuclear durante 72 horas de cultivo.

Pode-se observar que o processo de supressão da resposta apoptótica de linfócitos T por fibroblastos gengivais em co-cultura pode ser induzida com ácido butírico, possivelmente pela produção de IL-6 e IL-11, onde os neutrófilos parecem resgatar células epiteliais da apoptose (GALICIA *et al.*, 2009). Moléculas inibidoras de morte celular chamadas PD-1 (FIGUEIRA *et al.*, 2009), receptores do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) e de inibidores de caspase-3 (LUCAS *et al.*, 2010) estão presentes em lesões periodontais crônicas e podem estar envolvidas na inibição de apoptose.

O LPS de *Porphyromonas gingivalis* também pode prevenir neutrófilos HL60 de apoptose. Entretanto, este processo pode ser restaurado com a adição de IL-10, o que pode explicar o mecanismo para o desenvolvimento da inflamação periodontal destrutiva (MURRAY; WILTON, 2003).

2 – HIPÓTESES

H₁ - Antígenos de *Porphyromonas gingivalis* estimulam a expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas em CMSP de indivíduos com periodontite crônica.

H₀ - Antígenos de *Porphyromonas gingivalis* não estimulam a expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas em CMSP de indivíduos com periodontite crônica.

3 – OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação de antígenos de *Porphyromonas gingivalis* na indução de apoptose em CMSP de indivíduos com periodontite crônica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o comprometimento de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com e sem periodontite crônica sob estímulo *in vitro* do extrato total de *P.gingivalis* ATCC33277, além de rHmuY e mitógenos convencionais;
2. Estudar a expressão da proteína Fas em CMSP mediante o estímulo com o extrato sonicado e rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* em indivíduos com e sem periodontite;
3. Estudar a expressão da proteína Bcl-2 em CMSP mediante o estímulo com o extrato sonicado e rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* em indivíduos com e sem periodontite;

4.0 RESULTADOS:

4.1 MANUSCRITO:

Manuscrito a ser submetido ao *Journal of Clinical Periodontology*

Expressão das Proteínas Fas e Bcl-2 sob Estímulo da Proteína Recombinante HmuY de Porphyromonas gingivalis em Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP) de Indivíduos Portadores de Periodontite Crônica.

[P. C. Carvalho-Filho](#)¹, G. P. Sampaio¹, B. F. P. Pereira⁴, T. Olczak³, S. C. Trindade^{1,2}, M. T. Xavier^{1,4}, R. Meyer¹

¹Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil; ²Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil; ³Universidade de Wrocław, Faculdade de Biotecnologia, Laboratório de Bioquímica, Wrocław, Polônia; ⁴Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil.

Endereço para correspondência: Paulo Cirino de Carvalho Filho, LABIMUNO-ICS-UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon, s/n- Vale do Canela, Salvador, BA, 40110100-Brasil

Phone: 557199931108 / 557132455971

E-mail: pauloccf@yahoo.com

Título curto: *HmuY de P. gingivalis e Apoptose na Periodontite Crônica .*

Palavras chave: *Porphyromonas gingivalis, Periodontite crônica, HmuY, Bcl-2, Fas, Apoptose.*

Palavras no resumo: 199

Total de Palavras: 3.643

Tabelas + Figuras: 5

Referencias: 28

RESUMO

Introdução e Objetivos: A periodontite é uma doença multifatorial causada pela resposta imuno-inflamatória do hospedeiro sob estímulos bacterianos no periodonto. Este estudo objetivou investigar a expressão *in vitro* das proteínas Fas e Bcl-2 em Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP) estimuladas pela proteína rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*).

Métodos: Os 39 voluntários (18 - com periodontite crônica-PC e 21 - sem periodontite-SP) foram avaliados seguindo os descritores clínicos periodontais. As CMSP foram cultivadas sob o estímulo de *P. gingivalis* e os ensaios para a expressão de Bcl-2 e Fas (CD95) foram realizados após 48 horas. A fluorescência para CMSP com marcadores para CD3, CD4, CD8, Bcl-2 e CD95 foi determinada usando Citometria de Fluxo.

Resultados: A expressão de Bcl-2 em células T CD3⁺ de indivíduos com PC estimuladas com a proteína rHmuY foi maior do que nos SP (P=0,043) e também maior do que nas CMSP estimuladas pelo extrato total de *Pg ATCC 33277* e sem estímulo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na co-expressão dos marcadores CD3/CD4, CD3/CD8, Fas/Bcl-2 e CD3/Fas nas CMSP.

Conclusão: A proteína rHmuY pode representar um importante estímulo de *P. gingivalis* induzindo expressão elevada de Bcl-2 que possibilita a inibição de apoptose em CMSP de indivíduos com periodontite crônica.

PALAVRAS CHAVE: *Porphyromonas gingivalis*, *Periodontite crônica*, *HmuY*, *Bcl-2*, *Fas*, *Apoptose*.

INTRODUÇÃO

Porphyromonas gingivalis é um dos mais importantes agentes etiológicos associados com a periodontite, uma doença infecciosa e multifatorial. Os microrganismos aderem à película adquirida e formam uma colonização do tipo biofilme que resulta na inflamação dos tecidos de suporte dos dentes. Destacam-se nesse processo as espécies bacterianas: *Porphyromonas gingivalis* (HOSOGI, HAYAKAWA e ABIKO, 2001), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forshytia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Treponema denticola* (VINAYAK e VANDANA, 2007; ASHIMOTO et al., 1996).

Porphyromonas gingivalis precisa adquirir nutrientes para sobreviver e se multiplicar nos sítios infectados, utilizando como principal nutriente o grupo heme. Este é um co-fator dependente de ferro, indispensável para muitas enzimas e proteínas. A *P. gingivalis* libera o grupo heme das proteínas de ligação ao heme do hospedeiro

pela ação de proteases e faz o transporte para as células bacterianas através de duas proteínas, HmuY e HmuR, que se ligam ao heme livre e o transportam através da membrana da bactéria para o interior da célula. Essa função impõe rigorosas condições sobre essas proteínas em relação à estabilidade e resistência ao sistema imune do hospedeiro (WO' JTOWICZ *et al*, 2009).

HmuY é uma lipoproteína associada à membrana e pode ser identificada nas cepas de *P. gingivalis* A7436, 381, W50, W83, e ATCC33277 e em *Bacterioides fragiles* e *B. thetaiotaomicron* (Olczak *et al.*, 2008).

O gene *hmuR* nas cepas de *P. gingivalis* A7436 estão localizados em um operon com o gene *hmuY* e quatro genes não caracterizados (Olczak *et al.*, 2008). Uma estrutura idêntica a esse operon foi mostrada nas cepas de *P. gingivalis* W50, W83 e 381(Olczak *et al*, 2008, LEWIS *et al.*, 2006).

A proteína HmuY é altamente abundante na superfície externa da célula, em membranas externas de vesículas e é liberada em cultura na forma solúvel. HmuY é produzida constitutivamente em baixos níveis de crescimento na cultura bacteriana sob altas condições de hemina/ferro e em altos níveis, sob baixas condições de hemina/ferro, características do biofilme dental. Ela desempenha um papel significativo não somente na aquisição da Hemina, mas também na formação do biofilme dental. Tem-se sugerido que a proteína na superfície celular poderia ser reconhecida pelo sistema imunológico do hospedeiro durante a periodontite crônica e que a produção de anticorpos anti-HmuY poderia inibir a formação do biofilme (Olczak *et al.*, 2010).

Na doença periodontal, os sítios com inflamação contêm células do plasma, linfócitos T e macrófagos que produzirão muitos tipos de citocinas. Os linfócitos T podem ser encontrados no infiltrado inflamatório de defesa. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ estão presentes nas lesões periodontais e podem ser linfócitos T ativados de memória. Os linfócitos T do tipo Th1 e Th2 e sua associação com citocinas com uma subsequente polarização Th1 podem induzir a reabsorção óssea indiretamente por promover a diferenciação de precursores de osteoclastos e a sua subsequente ativação (JOHNSON, 2005; TAUBMAN, 2001).

Mais recentemente, células T regulatórias (Treg) (NAKAJIMA, 2005; CARDOSO, 2008) e células Th17 (OHYAMA *et al*, 2009; SCHENKEIN, 2010) têm sido demonstradas nos tecidos periodontais, aumentando a importância destas na imunorregulação da doença periodontal. As implicações clínicas nesses estudos podem

ser vistos na identificação da expressão gênica de citocinas Th1/Th2 e Treg/Th17 no sangue periférico e em transcriptomas salivares que agora estão sendo testados como possíveis marcadores de suscetibilidade à doença (OHLRICH, E.J.; CULLINAN, M.P.; SEYMOUR, G.J, 2009).

A apoptose associada com a destruição celular é um fenômeno presente nos sítios de inflamação crônica bacteriana na gengiva humana e é de grande importância na regulação da inflamação nas mucosas (TONETTI *et al.*, 1998).

A principal proteína pró-apoptótica é o Fas. A proteína Fas pertence à superfamília do receptor do TNF. O gene da proteína Fas (APO1 / CD95), localizado no braço longo do cromossomo 10, na região 2.3 (10q2.3), transcreve um receptor transmembrânico composto de 319 aminoácidos e peso molecular de 40KDa a 50KDa o qual, após sua ligação com o Fas ligante, induz apoptose por meio de seu domínio citoplasmático (Lichter *et al.*, 1992; Ju *et al.*, 1995).

A Bcl-2 é um membro da família de proteínas anti-apoptóticas que previne ou retarda a morte celular induzida por diversos estímulos. A família mitocondrial Bcl-2 compreende membros anti-apoptóticos como: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 e membros pró-apoptóticos como: Bax, Bak, Bok, Bid, Bad, Puma, Bmf, Bim, Bok, Noxa e Hrk/DP5. (URNOWEY *et al.*, 2006; YOULE e STRASSER, 2008).

A modulação da imunidade mediada por células pelos microrganismos na doença periodontal tem sido demonstrada desde os anos 70 (IVANY, WILTON e LEHNER, 1972; PATTERS, GENCO e REED, 1976; LANG e SMITH, 1977; CHURCH e DOLBY, 1978; BAKER *et al.*, 1978). A morte celular programada e a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em células mononucleares de sangue periférico sob o estímulo de periodontopatógenos ainda não são muito estudadas. Para testar a hipótese de que antígenos da *P. gingivalis*, incluindo HmuY, podem alterar as Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP), este estudo objetivou avaliar o potencial de apoptose e sobrevivência celular e expressão das proteínas Fas e Bcl-2 sob estimulação com o extrato bacteriano bruto de *P. gingivalis* e com a proteína recombinante HmuY.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes e controles. 18 pacientes com periodontite crônica (PC) e 21 sem periodontite (SP) foram recrutados no Centro de Especialidades Odontológicas da

Prefeitura Municipal de Salvador (CEO - Avenida Carlos Gomes) e no Departamento de Periodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, entre 2009 e 2010. Os seguintes critérios de exclusão foram estabelecidos: Presença de doença sistêmica, tabagismo, gestação, tratamento periodontal prévio, pelo menos um ano antes, tratamento com antibióticos nos últimos 6 meses e agentes antiinflamatórios com 2 meses antes do estudo. O consentimento livre e esclarecido foi obtido de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde e aprovado pelo Comitê de Ética da Maternidade Climério de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Bahia-Brasil (Número de Protocolo 053/2010).

O exame periodontal foi feito por um só profissional (P.C.C.F.) calibrado previamente (κ 0.832) usando uma sonda periodontal Williams (Hu Friedy, Chicago, IL, USA). Foram registrados: o índice de sangramento gengival à sondagem (ISG), o nível de inserção clínica (NIC) e a profundidade de sondagem (PS) em seis sítios (disto-vestibular, médio-vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, médio-lingual e mesio-lingual) para cada unidade dentária. Os indivíduos que tinham 4 ou mais dentes com um ou mais sítios com profundidade de sondagem de 4mm ou maior, com perda de inserção clínica maior ou igual a 3mm, e sangramento à sondagem no mesmo sítio, foram diagnosticados como portadores de periodontite (GOMES-FILHO I.S. et al, 2007). O caráter crônico da doença foi baseado no critério da Academia Americana de Periodontologia (ARMITAGE GC et al, 1999).

Parâmetros clínicos. Como mostrado na tabela 1, os dois grupos foram comparados em relação ao gênero e idade. A condição periodontal entre os grupos mostrou diferenças estatisticamente significantes. Não foram observadas diferenças em relação às características sócio-demográficas e de histórico clínico.

Antígenos. O extrato bruto da cepa de *P. gingivalis* ATCC 33277 (Extrato *Pg*) foi obtido como descrito previamente (TRINDADE SC et al., 2008) e usado em uma concentração final de 0,5 μ g/ml. A proteína rHmuY de *P. gingivalis*, com ausência dos primeiros 25 resíduos de aminoácidos, (NCBI accession no. CAM 31898) foi expressa usando o plasmídeo HmuY11 e *Escherichia coli* ER2566 (New England Biolabs). A proteína rHmuY foi purificada de uma fração solúvel de *E. coli* lisada como previamente descrito (OLCZAK T et al., 2008). Endotoxinas contaminantes foram removidas de todas as amostras de rHmuY usando colunas de remoção de endotoxinas Detoxi-Gel (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A proteína rHmuY foi usada na concentração final de 2,5 μ g/mL.

Coleta de Sangue. Vinte mililitros de sangue venoso periférico foram obtidos de cada indivíduo e coletados em tubos com heparina. CMSP foram obtidas do sangue periférico através de centrifugação por gradiente de densidade de acordo com as instruções do fabricante (SepCell, StemCell Technologies Inc., USA) e lavadas duas vezes em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium LGCBio, São Paulo, SP, Brasil).

Expressão de Fas e Bcl-2. CMSP foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços (10^6 células por poço) em meio de cultura RPMI contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução com antibiótico/antimicótico (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). As culturas foram mantidas por 48 h a 37°C , sob 5% de CO_2 e ar umidificado. As células foram também incubadas com Pokeweed (PWM - $5\mu\text{g}/\text{mL}$), extrato total de *Pg* ($0,5\mu\text{g}/\text{mL}$), proteína rHmuY ($2,5\mu\text{g}/\text{mL}$) ou sem antígenos. Todas as células foram coletadas por centrifugação e ressuspendidas em $500\ \mu\text{l}$ de tampão PBS $1\times$ concentrado. Os marcadores Bcl-2 PE CY, Fas (CD95) - fluorescein isothiocyanate (FITC) e CD3 PerCP-CY (Invitrogen Life Science, Carlsbad, CA, USA) foram usados de acordo com as instruções do fabricante para identificar a expressão da proteína anti-apoptótica (Bcl-2) e do receptor de morte (Fas). Para identificar a expressão dos marcadores CD3, CD4, CD8 foram utilizados os detectores de sinais FITC, PE CY e PerCP CY (BD FacsCalibur, Franklin Lakes, New Jersey, USA) para a citometria de fluxo, empregando o programa de aquisição CellQuest (BD). Os sinais de fluorescência foram registrados na forma de gráfico de dispersão de pontos (*dot-plot* ou citograma). Na análise, foram consideradas as médias de eventos celulares relativas ao quadrante do citograma duplamente marcado para os marcadores pesquisados, delimitados pela região R1 (Figura1). Durante todo o estudo, a calibração, a compensação das fluorescências e os parâmetros do citômetro foram mantidos constantes.

Análise estatística. O teste exato de Fischer foi usado para testar as variáveis categóricas. O teste de Mann-Whitney foi usado para testar a diferença entre os valores numéricos dos grupos. Foi considerado estatisticamente significativo o valor de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Expressão das proteínas Fas e BCL-2. No presente estudo, nós demonstramos que a expressão da proteína Bcl-2 em linfócitos T (CD3^+) induzida pela proteína recombinante HmuY ($P=0,043$) é mais alta em indivíduos portadores de periodontite crônica em comparação aos indivíduos sem periodontite (Figura 2 e Figura 3). Não

houve diferenças estatisticamente significantes referentes à co-expressão de CD3/Fas nas CMSP estimuladas com rHmuY de voluntários com periodontite crônica e em indivíduos sem periodontite. Entretanto, observou-se uma expressão mais elevada de Fas em CMSP no grupo com PC em comparação com o grupo SP (Figura 4). Também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na co-expressão dos marcadores para CD3/CD4, CD3/CD8, Fas/Bcl-2 em CMSP entre os grupos SP e PC.

DISCUSSÃO

Os principais achados desse estudo mostraram que rHmuY estimulou uma maior expressão de Bcl-2 em linfócitos T CD3⁺ de indivíduos portadores de periodontite crônica após 48 h, sugerindo que essa molécula induz um aumento na sobrevivência das CMSP por inibição da apoptose. Esses resultados corroboram com os achados de Bulut *et al.* (2006), ao demonstrar que uma alta expressão de Bcl-2 em indivíduos com periodontite agressiva, levou à um retardo no processo de apoptose, o que pode induzir as células inflamatórias a permanecerem localmente no tecido periodontal, com excessiva secreção de citocinas e finalmente com a progressiva destruição do tecido periodontal.

A apoptose é uma forma de morte celular mediada por caspases com características morfológicas e anti-inflamatórias particulares (COOKSON; FINK, 2005). Na ausência da fagocitose, os corpos apoptóticos podem sofrer lise e necrose secundária, também chamada de necrose apoptótica, ou apoptose tardia, lançando um conteúdo necrótico celular, incluindo moléculas que agem como sinais promotores de inflamação (SCAFFIDI, 2002; SHi, 2003). Em contraste, a absorção de corpos apoptóticos suprime a secreção de mediadores inflamatórios nos macrófagos ativados (FADOK *et al.*, 1998). Foi demonstrado aqui que a proteína rHmuY induziu um aumento da expressão de Bcl-2 em linfócitos T CD3⁺ de indivíduos com periodontite crônica, quando comparado com o grupo de indivíduos sem periodontite, sugerindo uma menor ocorrência de apoptose inicial de linfócitos T CD3⁺ nestes indivíduos, e por conseguinte resultar em uma maior sobrevivência dessas células, o que concorda com o trabalho de Trindade, 2010 que mostrou a ausência de apoptose inicial sob o estímulo de rHmuY.

Destarte, a menor expressão de Bcl-2 em CMSP de indivíduos sem periodontite sob o estímulo de rHmuY pode ser explicada por uma menor estimulação imunológica prévia por antígenos de *P. gingivalis*, o que leva à um aumento na apoptose de CMSP

em resposta a exposição antigênica primária, diferentemente de indivíduos com periodontite crônica que poderiam ter sido primados anteriormente pela exposição a essa bactéria nos sítios com lesão periodontal.

As proteínas Fas ou Fas ligante são expressas no tecido gengival inflamado e os linfócitos acumulados nas lesões periodontais crônicas podem ser susceptíveis a apoptose mediada por Fas. Os linfócitos Fas positivos isolados dessas lesões são facilmente levados à apoptose pelo anticorpo anti-Fas, que mimetiza a função do Fas ligante, enquanto estes linfócitos periféricos são resistentes à apoptose sob a mesma estimulação. Foi sugerido que a ausência de apoptose mediada por Fas em linfócitos ativado poderia contribuir para a cronicidade da doença e que o Fas ligante exógeno poderia ser um candidato para a proteção contra o perfil crônico da doença (SAWA *et al*, 1999). Nesse estudo observou-se expressão aumentada de Fas em linfócitos T CD3⁺ estimulados com extrato total de *P. gingivalis* e rHmuY. No entanto, os resultados observados não apresentaram significância estatística, sugerindo que esta não é a via apoptótica principal.

O desfecho inflamatório após o contato entre as células do hospedeiro e os antígenos da *P. gingivalis*, incluindo a rHmuY, é coerente com a sua relação entre necrose e aspectos da morte celular, como a ruptura da membrana e exibição de moléculas pró-inflamatórias. Mais estudos são necessários para avaliar o receptor respondedor para a proteína recombinante HmuY e a sinalização celular envolvida na morte programada das células, bem como o papel da rHmuY na infecção por *P. gingivalis in vivo*.

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a proteína rHmuY é um importante estímulo de *Pophyromonas gingivalis* por induzir um aumento na expressão da proteína Bcl-2 linfócitos T CD3⁺ de indivíduos portadores de periodontite crônica, sugerindo que a ausência ou retardo no processo de apoptose desempenha um importante papel na sobrevivência das células mononucleares de sangue periférico nestes pacientes, podendo contribuir para a cronicidade da doença.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil.

CONFLITO DE INTERESSE E SUPORTE FINANCEIRO

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse nesse estudo.

Esse estudo foi financiado pelo Programa de Pós-graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia (PPGIm / UFBA), e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) nº120/2006, Salvador, BA, Brasil.

RELEVÂNCIA CLÍNICA

Fundamentação científica: Na periodontite crônica, as células mononucleares de sangue periférico (CMSP) quando estimuladas por *P. gingivalis* podem se tornar resistentes a apoptose, permanecendo localmente no tecido inflamado, mantendo o estado crônico da doença.

Principais achados: Foi encontrada uma alta expressão da proteína Bcl-2 em CMSP estimuladas com a proteína rHmuY de *P. gingivalis* em indivíduos portadores de periodontite crônica.

Implicações práticas: A base molecular das interações entre hospedeiro e periodontopatógenos podem ser importantes para encontrar potenciais alvos para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas. A HmuY, uma proteína imunogênica de *P. gingivalis*, pode ser um candidato importante para estudos com estes objetivos.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1: Seleção das CMSP, na região R1, de pequeno tamanho (FSC) e baixa granularidade (SSC).

Figura 2: Exemplo de citograma ou dot-plot dos linfócitos T CD3⁺ que expressavam Bcl-2 de um indivíduo sem periodontite e de outro com periodontite crônica.

Figura 3: Expressão de Bcl-2 em linfócitos T CD3⁺ sob estimulação em 48-h com a proteína recombinante HmuY em indivíduos com periodontite crônica (PC) e sem periodontite (SP) avaliadas por citometria de fluxo. *P= 0, 043.

Figura 4: Expressão de Fas em linfócitos T CD3⁺ sob estimulação em 48-h com a proteína recombinante HmuY em indivíduos com periodontite crônica (PC) e sem periodontite (SP) avaliadas por citometria de fluxo.

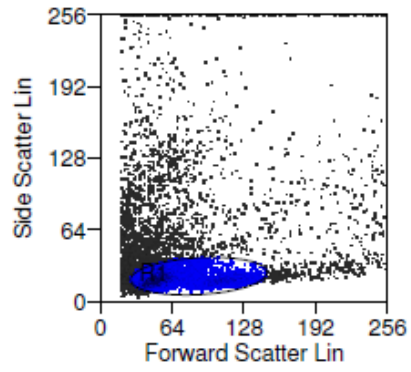
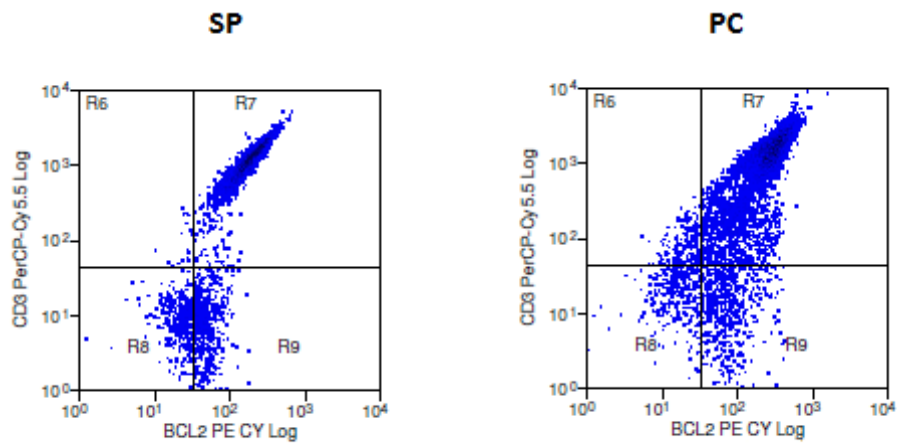
Figura 1:**Figura 2:**

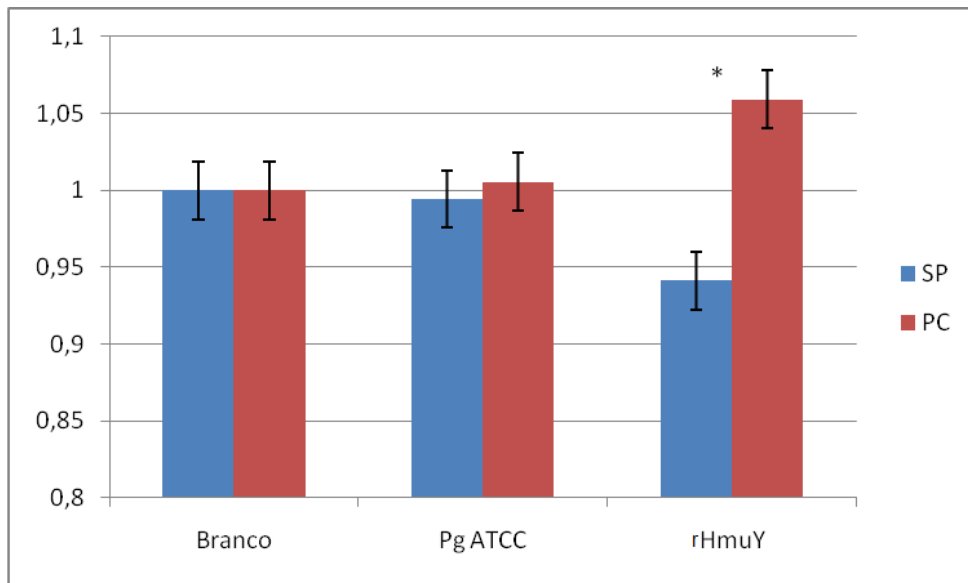
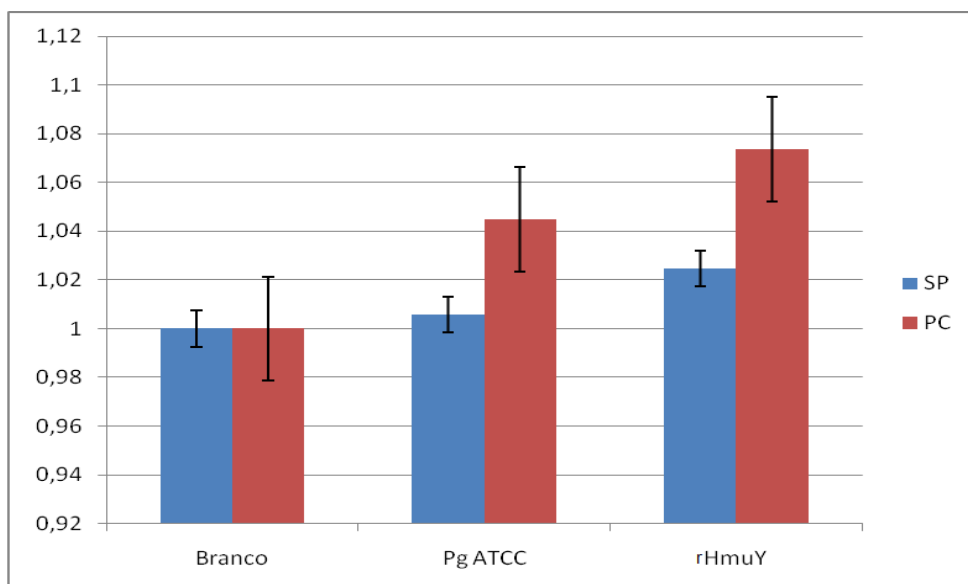
Figura 3:**Figura 4:**

Tabela 1: Achados Clínicos de indivíduos com Periodontite Crônica (PC) e Sem periodontite (SP).

	SP	PC	Valor de P
Homens / Mulheres	03 / 18	5 / 13	0,622
Idade (anos) (Média + DP)	36 ± 15,67	40,11 ± 14,67	0,231
Número de Dentes (Média + DP)	22,56 ± 7,45	22,65 ± 7,12	0,914
% Sítios ISG (Média + DP)	6,31 ± 13,93	35,82 ± 26,28	0,001
% PS ≥ 4 (Média + DP)	1,31 ± 1,94	14,71 ± 10,52	0,001
% NIC ≥ 3 (Média + DP)	12,26 ± 18,96	28,79 ± 26,04	0,059

DP: Desvio Padrão; ISG: Índice de Sangramento Gengival à Sondagem; PS: Profundidade de Sondagem; NIC: Nível de Inserção Clínica.

REFERÊNCIAS

ARMITAGE G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. In: 1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*; v.4, p.1-6, 1999.

ASAI, Y.; HASHIMOTO, M.; FLETCHER, H.M.; MIYAKE, K.; AKIRA, S.; OGAWA, T. Lipopolysaccharide preparation extracted from *Porphyromonas gingivalis* lipoproteindeficient mutant shows a marked decrease in toll-like receptor 2-mediated signaling. *Infect Immun*. v.73, p.2157-63, 2005.

ASHIMOTO, A. *et al.* Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*. v. 11, p.266-273, 1996.

BAKER, J.J.; WRIGHT, W.E.; CHAN S.P.; OPPENHEIM J.J. Longitudinal effects of clinical therapy and the edentulous state on the transformation of lymphocytes from patients with severe periodontitis. *Clin Exp Immunol*. v.34, p.199-205, 1978.

BASCONES, A.; GAMONAL, J.; GOMEZ, M.; SILVA, A.; GONZALEZ, M.A. New knowledge of the pathogenesis of periodontal disease. *Quintessence Int*. v.35, p.706-716, 2004.

BRAMANTI, T. E.; HOLT, S. C. Hemin uptake in *Porphyromonas gingivalis*: Omp 26 is a hemin-binding surface protein. *J. Bacteriol.* v.175, p7413–7420, 1993.

BROZOVIC, S.; SAHOO, R.; BARVE, S.; SHIBA, H.; URIARTE, S.; BLUMBERG, R.S.; KINANE, D.F. *Porphyromonas gingivalis* enhances FasL expression via upregulation of NFκB-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cells. *Microbiology.* v.152, p. 797–806, 2006.

BULUT, S.; USLU, H.; OZDEMIR, B.H.; BULUT, O.E. Expression of caspase-3, p53 and Bcl-2 in generalized aggressive periodontitis. *Head and Face Medicine.* v.2, p.17, 2006.

CARDOSO, C. R.; GARLET, G. P.; MOREIRA A. P.; MARTINS-JÚNIOR W.; ROSSI M. A.; SILVA J. S. Characterization of CD4⁺CD25⁺ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol.* v.84, p.311-318, 2008.

CHURCH, H.; DOLBY, E. The relationship between the dose of dentogingival plaque and the in vitro lymphoproliferative response in subjects with periodontal disease *J Oral Pathol.* v7, p.318-25, 1978.

COATS, S.R.; REIFE, R.A.; BAINBRIDGE, B.W.; PHAM, T-T. T. ; DARVEAU, R.P. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at toll-like receptor 4 in human endothelial cells. *Infect Immun.* v.71, n.12, p.6799-6807, 2003.

CRUCHTEN, S. V.; BROECK, W. V. D. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* v.31, p. 214-223, 2002.

DARVEAU, R.P.; TANNER, A.; PAGE, R.C. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000.* v.14, p.12-32, 1997.

DARVEAU, R.P.; PHAM, T-T. T.; LEMLEY, K.; REIFE, R.A.; BAINBRIDGE, B.W.; COATS S.R., *et al.* *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipide A species that functionally interacts with both toll-like receptor 2 and 4. *Infect Immun.* v.72, p.5041-51, 2004.

DEZEREGA, A.; POZO, P.; HERNANDEZ, M.; OYARZU'N, A.; RIVERA, O.; DUTZAN, N.; GUTIÉRREZ-FERNA'NDEZ, A.; OVERALL, C.M.; GARRIDO, M.; ALCOTA, M.; ORTIZ, E.; GAMONAL, J. Chemokine monocyte chemoattractant protein-3 in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis *J Periodontol.* v.81, p.267-276, 2010.

DYE, B.A.; HERRERA-ABREU, M.; LERCHE-SEHM, J.; VLACHOJANNIS, C.; PIKDOKEN, L.; PRETZL, B.; SCHWARTZ, A.; PAPAPANOU, P.N. Serum antibodies to periodontal bacteria as diagnostic markers of periodontitis. *J Periodontol.* 2009; v.80, p.634-647.

FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; KONOWAL, A.; FREED, P.W.; WESTCOTT; HENSON, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGFbeta, PGE2, and PAF. *J Clin Investing.* v101, p.890-98, 1998.

FIGUEIRA, E.A.; REZENDE, M.L.R.; TORRES, S.A.; GARLET, G.P.; LARA, V.S.; SANTOS, C.F.; AVILA-CAMPOS, M.J.; SILVA, J.S.; CAMPANELLI, A.P. Inhibitory signals mediated by programmed death-1 are involved with t-cell function in chronic periodontitis. *J Periodontol.* v.80, p.1833-1844, 2009.

FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* v73, p.1907-16, 2005.

GALICIA, J.C.; BENAKANAKERE, M.R.; STATHOPOULOU, P.G.; KINANE, D.F. Neutrophils rescue gingival epithelial cells from bacterial-induced apoptosis. *J Leukoc Biol.* v.86, p. 000–000; DOI: 10.1189/JLB.0109003, 2009.

GEATCH, D.R.; HARRIS, J.I.; HEASMAN, P.A.; TAYLOR, J.J. *In vitro* studies of lymphocyte apoptosis induced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res.* v.34, p.70-78, 1999.

GEMMEL, E.; SEYMOUR, G.J. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontology 2000.* v.35, p.21-41, 2004.

GENCO, C. A.; ODUSANYA, B. M.; BROWN, G. Binding and accumulation of hemin in *Porphyromonas gingivalis* are induced by hemin. *Infect. Immun.* v.62, p.2885–2892, 1994.

GENCO, C. A.; SIMPSON, W.; FORNG, R.Y.; EGAL, M.; ODUSANYA, B. M. B. Characterization of a Tn4351-generated hemin uptake mutant of *Porphyromonas gingivalis*: evidence for the coordinate regulation of virulence factors by hemin. *Infect. Immun.* v.63, p.2459–2466, 1995.

GILLESPIE, M.T. Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function. *Arthritis Research & Therapy.* v.9, p.103-106, 2007.

GOMES-FILHO, I.S.; CRUZ, S.S.; REZENDE, E.J.C. *et al.* Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol.* v.34, p.957–63, 2007.

GRAVES, D. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction *J Periodontol.* v.79, p.1585-1591, 2008.

HIRSCHFELD, M.; WEIS, J.J.; TOSHCHAKOV, V. *et al.* Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun.* v.69, p.1477-82, 2001.

HOSOGI, Y.; HAYAKAWA, M.; ABIKO, Y. Monoclonal antibody against *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin inhibits hemolytic activity. *Eur J Oral Sci.* v.109, p.109-113, 2001.

IMAMURA, T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol.* v. 74, n. 1, p. 111-118, 2003.

IMAMURA, T.; TRAVIS, J.; POTEPA, J. The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. *Curr Protein Pept Sci.* v.4,n.6, p.443-50, 2003.

INOMATA, M.; ISHIHARA, Y.; MATSUYAMA, T.; IMAMURA, T.; MARUYAMA, NOGUCHI, T; MATSUSHITA, K. Degradation of vascular endothelial thrombomodulin by arginine- and lysine-specific cysteine proteases from *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol.* v. 80, n. 9, p. 1511-1517, 2009.

IVANY, L.; WILTON, J.M.A.; LEHNER, T. Cell-mediated immunity in periodontal disease; cytotoxicity, migration inhibition and lymphocyte transformation studies. *Immunology.* v.22, p.141-145, 1972.

LEWIS, J.P.; PLATA, K.; FAN, Y.; ROSATO, A.; ANAYA, C. Transcriptional organization, regulation and role of the *Porphyromonas gingivalis* W83 hmu haemin-uptake locus, *Microbiology.* v.152, p.3367–3382, 2006.

JOHNSON, R.B.; SERIO F.G.. Interleukin-18 concentrations and pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal.* v.76, p.785-790, 2005.

JU, S.T.; PANKA, D.J.; CUI, H.E.R.; EL-KHATIB, M.; SHER, D.H.; STANGER, B.Z.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature.* v.373, p.444-448, 1995.

KARLINSON, M.R.; RUGTVEIT, J; BRANDTZAEG, P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown Cow's milk allergy. *J. Exp. Med.* v.199, P.1679-1688, 2004.

KAWAHATA, K.; MISAKI, Y.; YAMAUCHI, M; TSUNEKAWA, S; SETOGUCHI, K; MIYAZAKI, J; YAMAMOTO, K. Generation of CD4+ CD25+ regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in thymus and

from noautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *The journal of immunology*. v.168, p.4399-4405, 2002.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. v.26, p.239-257, 1972.

LANG, N; SMITH, F. Lymphocyte blastogenesis to plaque antigens in human periodontal disease I. Populations of varying severity of disease. *J Periodontal Res*. v.12, p.298-309, 1977.

LAUBER, K.; BOHN, E.; KROBER, S. M.; XIAO, Y. J.; BLUMENTHAL, S. G.; LINDEMANN, R. K.; MARINI, P.; WIEDIG, C.; ZOBYWALSKI, A.; BAKSH, S.; XU, Y.; AUTENRIETH, I. B.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; BELKA, C.; STUHLER, G.; WESSELBORG, S. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*. v.113, p.717–730, 2003.

LEWIS, J.P.; PLATA,K.; YU, F.; ROSATO, A.; ANAYA, C. Transcriptional organization, regulation and role of the *Porphyromonas gingivalis* W83 hmu haeminuptake locus. *Microbiol*. v. 152, p.3367–3382, 2006.

LICHTER, P.; WALCZAK, H.Ç.; WITZ, S.; BERHMANN, I.; KRAMMER, P.H. The human APO-1 antigen maps to 10q23, a region which is sythenic with mouse chromossome. *Genomics*. v.14, p.179-80, 1992.

LINDHE, J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral, *Guanabara-Koongan*,1999.

LUCAS, H.; BARTOLD, P.M.; DHARMAPATNI, A.A.S.S.K.; HOLDING, C.A.; HAYNES, D.R. Inhibition of Apoptosis in Periodontitis, *J Dent Res*. v.89, n.1, p.29-33, 2010.

MARTIN, S.J.; FINUCANE, D.M.; AMARANTE-MENDES, G.P.; O'BRIEN, G.A.; GREEN, D.R. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of

cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J. Biol. Chem.* v.271, p.28753–28756, 1996.

MIHARA, J.; YONEDA, T.; HOLT, S.C. Modulation of growth and function of human gingival fibroblasts by fibroblast-activating factor derived from *Porphyromonas gingivalis* w50. *Infect Immun.*; v.61, n.2, p.596-601, 1993a.

MIHARA, J.; YONEDA, T.; HOLT, S.C. Role of *porphyromonas gingivalis*-derived fibroblast-activating factor in bone resorption. *Infect Immun.* v.61, n.8, p. 3562-3564, 1993b.

MURRAY, D. A.; WILTON, J.M.A;. Lipopolysaccharide from the Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis* Prevents Apoptosis of HL60-Derived Neutrophils In Vitro. *Infection and Immunity.* v.71, n12, p.7232-7235, 2003.

NAKAJIMA, T; UEKI-MARUYAMA, K; ODA,T; OHSAWA,Y; ITO, H; SEYMOUR,G.J; YAMAZAKI K. Regulatory T-cells Infiltrate Periodontal Disease Tissues. *J Dent. Res.* v.84, p.639-643, 2005.

NELSON, K. E.; FLEISCHMANN, R. D.; DEBOY, R. T. *et al.* Complete genome sequence of the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol.* v.185, p.5591–5601, 2003.

NJOROGE, T.; GENCO, R.J.; SOJAR, H.T. *et al.* A role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect Immun.* v.65, p.1980–1984, 1997.

OFFENBACHER, S.; BARROS, S.P.; SINGER, R.E.; MOSS, K.; WILLIAMS, R.C.; BECK, J.D. Periodontal Disease at the Biofilm–Gingival Interface. *J Periodontol.* v.78, p.1911-1925, 2007.

OHLRICH, E.J.; CULLINAN, M.P.; SEYMOUR, G.J. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J.* v.54, p.2-10, 2009.

OHYAMA, H.; KATO-KOGOE, N.; KUHARA, A.; NISHIMURA, F.; NAKASHO, K.; YAMANEGI, K.; YAMADA, N.; HATA, M.; YAMANE, J.; TERADA, N. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res.* v.88, p.633-638, 2009.

OLCZAK, T.; SROKA, A.; POTEMPA, J.; OLCZAK, M. *Porphyromonas gingivalis* HmuY and HmuR – further characterization of a novel mechanism of heme utilization. *Arch Microbiol.* v.183, p.197-210, 2008.

OLCZAK, T.; WOJTOWICZ, H.; CIURASZKIEWICZ, J.; OLCZAK, M.R. Species specificity, surface exposure, protein expression, immunogenicity, and participation in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* HmuY. *BMC Microbiology.* v.10, p.134, 2010.

OLCZAK, T.; DIXON, D.W.; GENCO, C.A. Binding specificity of the *Porphyromonas gingivalis* heme and hemoglobin receptor HmuR, gingipain K, and gingipain R1 for heme, porphyrins, and metalloporphyrins. *J Bacteriol.* v.183, p.5599–5608, 2001.

OLCZAK, T.; SIMPSON, W.; LIU, X.; GENCO, C.A. Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Rev.* v.29, p.119-144, 2005.

OLCZAK, T.; SIUDEJA, K.; OLCZAK, M. Purification and initial characterization of a novel *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein expressed in *Escherichia coli* and insect cells. *Protein Expr Purif.* v.49, p.299–306, 2006.

OLCZAK, T.; SROKA, A.; POTEMPA, J.; OLCZAK, M. *Porphyromonas gingivalis* HmuY and HmuR – further characterization of a novel mechanism of heme utilization. *Arch Microbiol.* v.183, p.197-210, 2008.

PATTERS, M.R.; GENCO, R.J.; REED, M.J.; MASHIMO. Blastogenic response of human lymphocytes to oral bacterial antigens: comparison of individuals with periodontal disease to normal and edentulous subjects. *Infect Immun.* v.14, p.1213-20, 1976.

SAKAI, A.; OHSHIMA, M.; SUGANO, N.; OTSUKA, K.; ITO, K. Profiling the cytokines in gingival crevicular fluid using a cytokine antibody array. *J Periodontol.* v.77, p.856-864, 2006.

SAMALI, A.; ZHIVOTOVSKY, B.; JONES, D.; NAGATA, S.; ORRENIUS, S. Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ.* v.6, p.495-496, 1999.

SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* v.407, p.784-8, 2000.

SAWA, T; NISHIMURA, F; OHYAMA, H; TAKAHASH K; TAKASHIBA, S; MURAYAMA, Y. In vitro induction of activation-induced cell death in lymphocytes from chronic periodontal lesions by exogenous Fas ligand. *Infection and Immunity.* v.67, n.3, p.1450-1454, 1999.

SCAFFIDI, P.; MISTELI, T.; BIANCHI, M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* v.418, p.191-195, 2002.

SCHENKEIN, H.A.; KOERTGE, T.E.; BROOKS, C.N.; SABATINI, R.; PURKALL, D.E.; TEW, J.G. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res.* v.89, p.943-947, 2010.

SHEETS, S.N.; POTEMPA, J.; TRAVIS, J.; FLETCHER, H.M.; CASIANO, C.A. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 synergistically disrupt endothelial cell adhesion and can induce caspase-independent apoptosis. *Infect Immun.* v.74, p.5667-5678, 2006.

SHI, Y.; EVANS, J.E.; ROCK, K.L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.* v.425, p.516-521, 2003.

SIMPSON, W.; OLCZAK, T.; GENCO, C.A. Characterization and expression of hmur, a tonb-dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* v.182, n.20, p. 5737-5748, 2000.

SIMPSON, W.; OLCZAK, T.; GENCO, C.A. Lysine-specific gingipain K and heme/hemoglobin receptor HmuR are involved in heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *Acta Biochim Pol.* v. 51, p.253–262, 2004.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* v.25, p.134-144, 1998.

TAUBAN, M.A.; KAWAI, T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Biol Med.* v.12, p.125-135, 2001.

TIETZE, K.; DALPKE, A.; MORATH, S.; MUTTERS, R.; HEEG, K.; NONNENMACHER, C. Differences in innate immune responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria. *J Periodont Res.* v.41, n.5, p.447-454, 2006.

TRINDADE SC, GOMES-FILHO, IS, MEYER RJ, VALE, VC, PUGLIESES L, FREIRE S. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. *J Int Acad Periodontol.* v.10, p.50-58, 2008.

TRINDADE, S.C. Avaliação in vitro do perfil de resposta Imune específica para *Porphyromonas gingivalis* e do padrão de polimorfismo genético de citocinas na periodontite crônica. 2010. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador, 2010.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol.* v.14, p.103-110, 2002.

URNOWEY, S.; ANSAI, T.; BITKOV; NAKAYAMA, K; TAKEHARA, T.; BARIK, S. Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: potential role of bacterial proteases in host signaling. *BMC Microbiology.* v.6, p.26, 2006.

VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L. J.; RAMAEKERS, F. C.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. v.31, p.1–9, 1998.

VARDAR-SENGUL, S.; ARORA, S.; BAYLAS, H.; MERCOLA, D. Expression profile of human gingival fibroblasts induced by interleukin-1 β reveals central role of nuclear factor-kappa b in stabilizing human gingival fibroblasts during inflammation. *J Periodontol*. v.80, p.833-849, 2009.

VINAYAK, M.J.; VANDANA, K.L. The detection of eight putative periodontal pathogens in adult and rapidly progressive periodontitis patients: An institutional study. *Indian J Dent Res*. v.18, p.6-10, 2007.

WALTER, C.; ZAHLTEN, J.; SCHMECK, B. *et al.* Porphyromonas gingivalis strain-independent activation of human endothelial cells. *Infect Immun*. v. 72, p.5910–5918, 2004.

WOJTOWICZ, H; GUEVARA, T; TALLANT, C; OLCZAK, M; SROKA, A; POTEMLA, J; SOLA, M; OLCZAK, T; GOMIS-RU, F. X. Unique structure and stability of HMUY, a novel heme-binding protein of Porphyromonas gingivalis. *PLoS Pathogens*. v.5, n.5, e1000419, 2009.

YILMAZ, O.; JUNGAS, T.; VERBEKE, P.; OJCIUS, D.M. Activation of Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*.; v.72, p.3743-3751, 2004.

YOULE RJ, STRASSER A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature*. v.9, p.59, 2008.

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO 1:



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
IORG0003460. Assurance FWA00002471, October 26, 2010
IRB00004123, October 5, 2007 - October 4, 2010
 Rua Augusto Viana, s/nº, Canela – Hospital Universitario Professor Edgard Santos, 1º andar
 Cep: 40.110-160 – Salvador-Bahia telefax: (71) 3283-8043 e-mail: cep/mco@ufba.br homepage: www.cep/mco.ufba.br

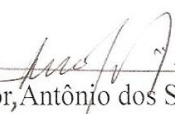
PARECER/RESOLUÇÃO ADITIVA N.º 053/2010

Para análise e deliberação deste Institucional a Doutora **Márcia Tosta Xavier**, Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa “**Avaliação do Fenótipo de Células T e Apoptose em PBMC de Indivíduos Portadores de Periodontite Crônica**”. (*Evaluation of T cells Phenotypes and Apoptosis in Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC, of individuals with Chronic Periodontitis*) posto sob pendência, por este Colegiado, em 16 de Dezembro de 2009 através do Parecer/Resolução N° 107/2009, apresentou, a “**Versão atualizada do Projeto de Pesquisa**”, datada de **23 de Fevereiro de 2010** que atendeu satisfatoriamente aos questionamentos pontuados no referido Parecer.

Inexistindo na proposição analisada conflito administrativo, processual e ético que contra-indique a incorporação pretendida e a consequente continuidade executória local do Estudo, fica a mesma **aprovada** por esta Instância.

APROVADO

Salvador, 12 de Março de 2010.


 Professor, Doutor, Antônio dos Santos Barata
 Coordenador – CEP/MCO/UFBA

Observações importantes. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste (a) ao (à) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução, bem como as “Recomendações Adicionais” apensas, além da **impostergável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação**, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).

Doença de Crhon		Sim
Colite Ulcerativa		Sim
Malária		Sim
Herpes		Sim

	Não
	Não
	Não
	Não

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

Já se submeteu a alguma destas cirurgias?

Amigdalectomia		Sim
Adenoidectomia		Sim
Apendicectomia		Sim
Esplenectomia		Sim

	Não
	Não
	Não
	Não

	anos
	anos
	anos
	anos

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

	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não

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

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

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

HÁBITOS DE HIGIENE ORAL

Quantas vezes escova seus dentes ao dia?

	1 vez
	2 vezes
	3 vezes ou +

	Fio	
	palito	
	escova interdental	
	escova bitufo	
	bochechos	Qual?

O que você acha da sua condição bucal?

	Ótima
	Boa
	Ruim
	Não está preocupado com ela

Assinatura do examinador:

Assinatura do paciente:

APÊNDICE 3:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto:**Avaliação do Fenótipo de Células T e Apoptose em Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) de Indivíduos Portadores de Periodontite Crônica.****Para ser lido para ou por todos os participantes do estudo**

As informações a seguir descrevem o estudo e os seus direitos como participante. Além do que for aqui esclarecido, o entrevistador poderá responder qualquer questão que você tenha referente ao estudo. Por favor, leia ou ouça com atenção e sempre que achar necessário interrompa para perguntar.

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa. Antes de decidir, é importante que você entenda o porquê da realização desta pesquisa e o que ela envolve. Por favor, dedique um tempo para ler cuidadosamente as informações seguintes e se preferir, discutir com seus familiares, amigos ou com seu médico. Se você desejar, pode levar este material para casa para pensar melhor. Nos pergunte se houver qualquer coisa que não esteja clara ou se precisar de mais informações.

Justificativa e Objetivos do estudo: A Periodontite é uma doença que se caracteriza por uma inflamação e perda do osso que envolve os dentes, levando ao amolecimento dos dentes, mau hálito e até mesmo a comprometimentos da saúde geral da pessoa. O estudo das células e moléculas envolvidas no processo inflamatório será importante para compreender melhor a atividade desta doença e os seus fatores de risco, inclusive os fatores genéticos. Os resultados nos ajudarão a ter uma melhor compreensão desta doença e poderão possibilitar um crescimento científico relacionado a este tema, inclusive influenciando na forma de prevenir e tratar esta doença.

Os objetivos deste estudo são: Estudar a indução de morte celular (apoptose) e atividade das células de defesa (linfócitos Treg e Th17) em Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) de indivíduos com periodontite crônica, frente ao estímulo da bactéria *Porphyromonas gingivalis*.

Procedimentos: Serão realizados: preenchimentos de questionários com perguntas sobre sua saúde e seus hábitos de higiene da boca e exames para diagnóstico da doença periodontal realizado por dentistas (utilizando-se instrumentos apropriados para avaliar a gengiva). Será coletada uma amostra de sangue (20 mL) do braço (exame de sangue) por uma pessoa treinada para isso. Todo o material coletado será descartado depois de feitos os exames necessários para este projeto.

Os desconfortos ou riscos esperados: Durante os exames ou durante a coleta dos fluidos você pode sentir um desconforto momentâneo. Os exames periodontais que serão realizados são exames rotineiramente efetuados por dentistas em consultórios ou serviços odontológicos. Após a coleta de sangue do seu braço, pode formar-se um hematoma (ficar um pouco roxo), mas os profissionais dispõem de meios para contornar estes efeitos indesejáveis.

Os benefícios que se pode ter: Participando desta pesquisa você **não** receberá nenhum tipo de benefício direto como dinheiro, mas estará contribuindo para a elaboração de um trabalho científico que poderá proporcionar benefícios futuros à sociedade. Os periodontistas envolvidos na pesquisa, juntamente com os estudantes de Odontologia que ajudarão no projeto, realizarão gratuitamente o seu tratamento periodontal.

Garantia de resposta a qualquer pergunta: A qualquer momento, você poderá fazer perguntas sobre esta pesquisa com a garantia de que estas serão respondidas.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si: A qualquer momento você poderá entrar em contato com os pesquisadores desta pesquisa e pedir que os seus dados sejam retirados da mesma, sem qualquer prejuízo para o seu atendimento no Centro de Especialidades Odontológicas da Secretaria Municipal da cidade de Salvador.

Garantia de privacidade: Os dados obtidos neste estudo, bem como fotografias que possam ser tiradas com sua autorização, serão apresentados em congressos e encontros da comunidade científica e poderão ser publicados em revistas especializadas. No entanto, **a sua identidade nunca será revelada.** E seu rosto nunca será mostrado totalmente nas fotografias (seus olhos serão cobertos com uma tarja preta). E independente de concordar ou não com a realização das fotografias, você não será excluído do estudo.

Disponibilidade de tratamento médico e indenização em caso de danos; garantia de que custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorram danos à sua saúde, causados diretamente pela pesquisa, você terá direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Nenhum custo adicional será cobrado a você, pois estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Para o esclarecimento de dúvidas sobre o projeto, você participante pode entrar em contato com o pesquisador Paulo Cirino de Carvalho Filho nos telefones (75)3421-1271/ (75) 9978-0502.

Antes de assinar este documento, eu fui suficientemente informado(a) sobre o projeto de pesquisa: os objetivos, os inconvenientes, os benefícios, os perigos que podem ocorrer quando eu estiver participando da pesquisa. Eu conversei diretamente com o(a) meu(minha) dentista e ele(a) respondeu todas as perguntas que fiz com relação a pesquisa sem deixar dúvidas. Eu sei que posso desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Aceito participar voluntariamente da pesquisa, permitindo que meus registros médicos sejam inspecionados por representantes da empresa que patrocina a pesquisa e por representantes do governo para conferir se o estudo está sendo realizado corretamente.

Nome do(a) Paciente	Assinatura ou Impressão Digital	Data
Pessoa que apresentou a pesquisa se não for o Investigador-principal	Assinatura	Data
Nome do Investigador-principal	Assinatura	Data

* Concordo, se solicitado for, com a realização de fotografias:

Nome do(a) Paciente	Assinatura ou Impressão Digital	Data
Testemunhas:		
Testemunha 01	Assinatura	Data
Testemunha 02	Assinatura	Data

Profª Drª Márcia Tosta Xavier: Avenida Cardeal da Silva, 1729, Apt 1101 - Federação
Salvador-BA. Telefone: (71)3261-3442

Paulo Cirino de Carvalho Filho: Avenida Cardeal da Silva, 447, Apt 1201 - Federação
Salvador-BA. Telefones: (71)3245-9344/ (75) 9978-0502

ATENÇÃO: A SUA PARTICIPAÇÃO EM QUALQUER TIPO DE PESQUISA É
VOLUNTÁRIA. EM CASO DE DÚVIDA QUANTO AOS SEUS DIREITOS
ESCREVA PARA:

Comitê de Ética em Pesquisa
Maternidade Climério de Oliveira
Universidade Federal a Bahia

Rua Augusto Viana, s/nº, – Canela
Hospital Universitário Professor Edgard Santos, 1º andar.
Cep.: 40.110-160 Salvador, BA

Tel.: (71) 32838043 Homepage: www.cepmco.ufba.br e-mail:
cepmco@ufba.br

Horário de Funcionamento: 08 às 12h - 14 às 18h (Seg. à Sex)
Coordenador: Prof. Dr. Antônio dos Santos Barata

1ª via para o(a) Paciente
2ª via para o Investigador-principal