



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

ANA CARLA MONTINO PIMENTEL

**O PAPEL DE HmuY DE *Porphyromonas gingivalis* NA
PRODUÇÃO DE HSP60 POR CÉLULAS MONONUCLEARES
DO SANGUE PERIFÉRICO DE PORTADORES DE
PERIODONTITE CRÔNICA**

Salvador
2014

ANA CARLA MONTINO PIMENTEL

**O PAPEL DE HmuY DE *Porphyromonas gingivalis* NA
PRODUÇÃO DE HSP60 POR CÉLULAS MONONUCLEARES
DO SANGUE PERIFÉRICO DE PORTADORES DE
PERIODONTITE CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dr^a Soraya Castro Trindade
Co-orientadora: Profa. Dr^a Marcia Tosta Xavier

Salvador
2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Saúde, SIBI - UFBA.

P644 Pimentel, Ana Carla Montino

O papel de HmuY de *Porphyromonas gingivalis* na produção de HSP60 por células mononucleares do sangue periférico de portadores de periodontite crônica / Ana Carla Montino Pimentel. – Salvador, 2014.

54 f.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Soraya Castro Trindade.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. *Porphyromonas gingivalis*. 2. Periodontite crônica. 3. HSP60. I. Trindade, Soraya Castro. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

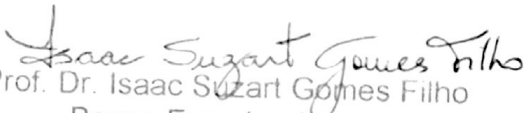
CDU 616.314.17



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA **Ana Carla Montino Pimentel**

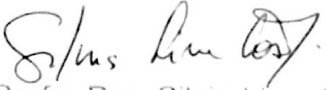
Aos dezoito dias do mês de março do ano de dois mil e quatorze, às treze e trinta horas, no **Auditório do Programa – Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas 4º andar**, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. **Soraya Castro Trindade** Orientadora, Dr. **Isaac Suzart Gomes Filho**, Dra. **Líliá Ferreira de Moura Costa** se reúne com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado: "**O PAPEL DE HMUY DE *Porphyromonas gingivalis* NA PRODUÇÃO DE HSP60 POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO DE PORTADORES DE PERIODONTITE CRÔNICA**" da Mestranda **Ana Carla Montino Pimentel**. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para Banca Examinadora conclui que a pós-graduanda 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 lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelas componentes da Banca examinadora, pela Mestranda e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação. Salvador, dezoito de março do ano de 2014.


Profa. Dra. Soraya Castro Trindade
Orientadora


Prof. Dr. Isaac Suzart Gomes Filho
Banca Examinadora


Profa. Dra. Líliá Ferreira de Moura Costa
Banca Examinadora


Ana Carla Montino Pimentel
Mestranda


Profa. Dra. Silvia Lima Costa
Coordenadora do PPGIm
ICS/UFBA

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa sendo finalizada e não conseguiria alcançá-la sozinha, Deus sempre abençoando o meu caminho e colocando pessoas especiais em minha vida. Inicialmente agradeço a meus pais, Carlos e Ana Célia, sei do sacrifício que fizeram em prol do meu desenvolvimento pessoal e profissional, tenho certeza que não conseguiria sem eles por perto.

Aos meus irmãos, Carlison e Jhielson, que são essenciais em minha vida estando sempre à disposição quando preciso.

Ao meu noivo, Solon, pelo companheirismo e compreensão, é muito bom tê-lo ao meu lado neste momento.

Ao Prof. Dr. Roberto Meyer por ter permitido que este projeto pessoal de fazer o mestrado tenha se tornado realidade ao se dispor para esta linha de pesquisa na periodontia.

Às minhas queridas, Prof^a Dr^a Soraya Trindade (orientadora) e Prof^a Dr^a Marcia Tosta (co-orientadora), competentiíssimas no que fazem e extremamente humanas, fui muito bem acolhida por elas e espero ter feito valer todo este cuidado e atenção que me deram.

Ao meu parceiro de trabalho Paulo Cirino, uma pessoa extremamente disponível a ajudar, com quem aprendi muito a vivência de laboratório.

Às estagiárias, Patrícia Mares e Sibelle Almeida, pela disponibilidade à nossa pesquisa, com certeza irão longe nesta profissão.

Ao prof. Adriano Alcântara, pela cooperação na pesquisa e atenção, sempre que precisava estava à disposição.

Aos colegas de laboratório, Marcos, Tadeu, Rosa, Alex, Geraldo por todo apoio dado no decorrer da pesquisa.

Aos funcionários do labimuno, Chica, Luciene, Mario, Zé e Manoel e do PPGIM, Dilcea.

Aos funcionários dos CEO de Lauro de Freitas e da Federação, pela recepção a nossa equipe e apoio nas coletas.

Aos meus queridos colegas de mestrado, aprendi muito com esta turma.

À profa. Tereza Olczak, por disponibilizar a proteína recombinante utilizada não só neste trabalho, assim como em outros previamente publicados.

“Não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.” (Augusto Cury)

PIMENTEL, Ana Carla Montino. O Papel de HmuY de *Porphyromonas gingivalis* na produção de HSP60 por células mononucleares do sangue periférico de portadores de periodontite crônica . 54 f. 2014. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

RESUMO

A periodontite crônica apresenta etiologia multifatorial, tendo como um dos principais agentes etiológicos *Porphyromonas gingivalis*, um microrganismo que possui uma ampla gama de fatores de virulência, com potencial antigênico, tais como a proteína HmuY. O objetivo deste estudo piloto foi avaliar os níveis da proteína de choque térmico (HSP) 60 autóloga em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com periodontite crônica sob estímulo da proteína recombinante HmuY de *Porphyromonas gingivalis*. As células de 27 voluntários (16 sem periodontite (SP) e 11 com periodontite crônica (PC)) foram cultivadas sob estímulos de mitógeno *Pokeweed* e proteína rHmuY e sem estímulo por 48 horas. Após este período foi realizado o ensaio imunoenzimático ELISA no sobrenadante das culturas para avaliar os níveis de HSP60 em CMSP. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos PC e SP, submetidos aos diferentes estímulos ou não, embora as células de indivíduos SP cultivadas sem estímulo tenham apresentado níveis mais elevados que as células dos portadores de periodontite. No entanto, quando foram agrupadas as amostras de todos os participantes do estudo para avaliar as diferenças entre as três formas de cultivo, as células cultivadas em presença do mitógeno *Pokeweed* apresentaram níveis superiores de HSP60 quando comparadas aos níveis daquelas cultivadas em presença de rHmuY ($p=0,03$). Não foram observadas diferenças nos níveis de HSP60 entre as células cultivadas com o mitógeno *Pokeweed* e as células cultivadas sem estímulo, nem entre estas últimas e as células cultivadas com rHmuY. Os achados preliminares sugerem que o HmuY de *Porphyromonas gingivalis* não altera os níveis de HSP60 em CMSP humanas, porém é possível que a expressão de HSP60 na célula humana exerça um papel protetor contra a periodontite..

Palavras-chave: *Porphyromonas gingivalis*, Periodontite crônica, HmuY, HSP60 humana.

PIMENTEL A.C.M. The role of *Porphyromonas gingivalis*'s HmuY in production of HSP60 by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic periodontitis. 2014. 54f. Dissertation (Master's degree in immunology) – Institute of Health Sciences, UFBA, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Chronic periodontitis presents a multifactorial etiology, and one of the main etiologic agents is *Porphyromonas gingivalis*, a microorganism that has a wide range of virulence factors, with antigenic potential, such as HmuY protein. The objective of this pilot study was to evaluate the levels of heat shock protein (HSP) 60 human in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with chronic periodontitis under stimulus of the recombinant protein HmuY of *Porphyromonas gingivalis*. Cells from 27 volunteers (16 with no periodontitis (NP) and 11 with chronic periodontitis (CP)) were cultivated under stimuli of *Pokeweed* mitogen, protein rHmuY and without stimulation for 48 hours. After this period, the enzyme immunoassay ELISA was performed in the supernatant of cultures to evaluate the levels of HSP60 in PBMC. It was not observed statistically significant differences between the PC and NP groups, subjected to different stimuli, although cells of individuals NP cultivated without stimulation appear to have higher levels than the cells of patients with periodontitis. However, when the samples from all study participants were grouped to evaluate differences among the three forms of culture, the cells cultivated in the presence of *Pokeweed* mitogen presented had higher levels of HSP60 when compared to those cultivated in the presence of rHmuY ($p=0,03$). No differences were observed in the levels of HSP60 between cells cultured with *Pokeweed* mitogen and cells cultured without stimuli, neither among these nor the cultured cells with rHmuY. *Porphyromonas gingivalis* HmuY does not change the production of HSP60 in PBMC human, however it is possible that the expression of HSP60 in human cells performs a protective role against periodontitis.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*, Chronic Periodontitis, HmuY, HSP60 human.

LISTA DE FIGURA, TABELA E GRÁFICOS

- Figura 1 Diagrama representando o relacionamento entre as espécies dentro de complexos microbianos e entre complexos microbianos. 12
- Tabela 1 Características gerais dos participantes do grupo sem periodontite (**SP**) e com periodontite (**PC**). Salvador, Bahia, Brasil, 2014 (n=27). 31
- Gráfico 1 Níveis de HSP 60 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de voluntários sem periodontite (**SP**) e com periodontite crônica (**PC**) expostos a diferentes condições: sem estímulos de antígenos/mitógenos, estimuladas com *Pokewee* (PWN) e om rHmuY. 32
- Gráfico 2 Níveis de HSP 60 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) do total de pacientes exposto a diferentes condições: células sem antígenos/mitógenos; PWN; rHmuY. 33

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Etiologia e patogênese da periodontite	11
2.2	Classificação da periodontite	13
2.3	O papel de <i>Porphyromonas gingivalis</i> na etiologia da periodontite crônica	15
2.4	Proteínas de choque térmico autólogas	18
3.	OBJETIVOS	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	População e área do estudo	23
4.2	Desenho do estudo	23
4.3	Procedimentos de amostragem	23
4.4	Avaliação da condição periodontal	24
4.5	Diagnóstico periodontal	26
4.6	Preparo de proteína recombinante HmuY	26
4.7	Coleta de sangue e separação de CMSP	27
4.8	Cultivo Celular	27
4.9	Ensaio Imunoenzimático ELISA para detecção de HSP60	27
4.10	Procedimento de análise de dados	27
5.	RESULTADOS	29
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÕES	37
8	REFERÊNCIAS	38
9	APÊNDICES E ANEXO	42

1- INTRODUÇÃO

A periodontite é um processo infeccioso, que gera uma resposta imuno-inflamatória capaz de promover destruição dos tecidos de suporte dentário. Na periodontite crônica, o principal agente etiológico envolvido é *Porphyromonas gingivalis*, por apresentar um arranjo de fatores de virulência, aumentando sua infectividade e possibilitando que o mesmo multiplique e resista às condições de limitação de nutrientes no periodonto.

Dentre esses fatores de virulência destaca-se a proteína de membrana HmuY utilizada pelo microrganismo, de uma maneira geral, para obter o nutriente ferro necessário para sua sobrevivência e crescimento, sendo encontrado em maior abundância na forma de heme, um co-fator para o estoque de oxigênio, transporte de elétrons e bioquímica de oxirredução, obtido principalmente da hemoglobina. Esta proteína possui também um papel no acúmulo de biofilme em superfícies abióticas, sendo demonstrado que a sua expressão é aumentada em condições de baixos níveis de ferro/heme, condições nas quais observou-se o referido acúmulo (OLCZAK et al., 2010).

O potencial imunogênico de HmuY de *Porphyromonas gingivalis*, vem sendo demonstrado, observando-se a sua capacidade de promover o processo inflamatório, induzindo altos níveis de IL-1 β e IL-6 (TRINDADE et al., 2012; TRINDADE et al., 2013). Além disso, HmuY parece participar de uma resposta mais tardia com o aumento nos níveis de IL-10, IgG e IgG1 anti-HmuY e inibição da produção de IL-8 em pacientes com periodontite crônica (TRINDADE et al., 2012), assim como alta produção de IL-6 (TRINDADE et al., 2013). No processo de morte celular programada, a proteína induziu altos níveis de Bcl-2, resultando na apoptose tardia em células mononucleares do sangue periférico (CMSP), necrose celular e liberação de seu conteúdo, prolongando o processo de destruição tecidual (TRINDADE et al., 2012 ;CARVALHO-FILHO et al., 2013).

Em resposta a agressões provocadas pelos microrganismos durante a infecção, é sabido que as células possuem mecanismos de resistência bastante eficazes, como as proteínas de choque térmico (HSP). Estas atuam durante esta condição de estresse da célula, tentando manter a sua homeostasia. Em condições de estresse, há um aumento na expressão de HSP, que irão proteger proteínas desdobradas e polipeptídeos, prevenindo o seu desdobramento e sua agregação, assim como, auxiliam no correto dobramento destas proteínas. Além disso, estas proteínas podem agir como moléculas sinalizadoras intercelulares, exercendo um papel na progressão do ciclo celular, na apoptose e estando envolvidas em alguns processos de doença. Recentes estudos têm mostrado evidências que HSP possui propriedades que permite seu uso na geração de respostas imune específicas contra câncer e agentes infecciosos (PARSELL & LINDQUIST, 1993; LI, et al., 2002; SEGAL et al., 2006; CAPELLO et al., 2008; JEGO et al., 2013).

HSP60 é uma chaperonina mitocondrial, mas que pode ser encontrada no citosol. Ela auxilia no dobramento de proteínas mitocondriais e facilita a degradação proteolítica de proteínas mal formadas ou desnaturadas. Dependendo de sua localização, pode apresentar funções pró- e anti- apoptóticas (CHANDRA et al., 2007)

Diante deste panorama, este estudo objetivou entender a influência de HmuY de *Porphyromonas gingivalis* sobre os níveis de HSP60 autóloga em indivíduos com periodontite comparados a indivíduos sem a doença.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA PERIODONTITE

A periodontite é uma doença infecciosa geradora de condições inflamatórias, que resultam na destruição dos tecidos de sustentação dos dentes (osso, ligamento periodontal e cemento) (VAN DYKE & SERHAN, 2003). Clinicamente é caracterizada pela perda de tecido conjuntivo de inserção ao dente na presença de inflamação gengival. Associada à perda de inserção há a migração do epitélio juncional e oral ao longo da superfície dentária e reabsorção óssea (ARMITAGE, 1999).

O biofilme é uma comunidade polimicrobiana inserida à superfícies bióticas e abióticas, que inicia sua formação a partir da colonização de células individuais que formam microcolônias, e secretam substâncias poliméricas extracelulares, permitindo a adesão de outros microrganismos e maturação do biofilme. Apesar de mais de 350 espécies bacterianas terem sido isoladas de bolsas periodontais, de diferentes indivíduos, é provável que uma pequena porcentagem destas esteja associada diretamente a destruição tecidual resultante da doença (PASTER et al., 2001; BEREZOW & DARVEAU, 2011). Socransky e colaboradores (1998) observaram após a análise de 13000 amostras de biofilme subgengival de 185 indivíduos adultos, uma íntima relação entre seis grupos de espécies microbianas, onde as espécies pertencentes ao complexo amarelo (*Actinomyces* e membros do gênero *Streptococcus*), complexo verde (Espécies de *Capnocytophaga*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo A, *Eikenella corrodens* e *Campylobacter concisus*) e do complexo roxo (*Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*) são colonizadores primários da superfície dentária cujo crescimento precede a multiplicação dos complexos laranja (*Campylobacter gracilis*, *Campylobacter*

rectus, *Campylobacter showae*, e *nodatum*, subespécies de *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Sconstellatus*) e do complexo vermelho (*Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*). Estes dois últimos complexos são considerados os principais agentes etiológicos da periodontite (Figura 1).

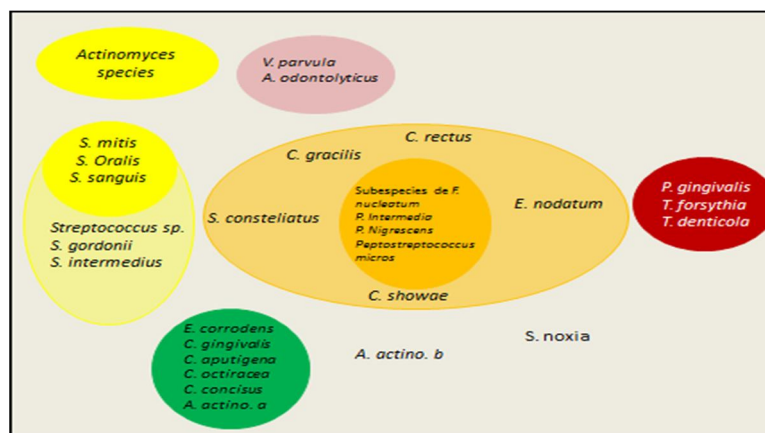


Figura 1: Diagrama representando o relacionamento entre as espécies dentro de complexos microbianos e entre complexos microbianos.

Fonte: S Soccransky, AD Haffajje, 2005. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000, 38:135-187

A patogênese da periodontite depende em parte da virulência dos micro-organismos envolvidos, assim como da presença e concentração destes, capazes de iniciar o processo de doença. Para tanto, se faz necessário que a bactéria desenvolva mecanismos que permitam a colonização tecidual, evasão da defesa do hospedeiro e a produção de substâncias que podem diretamente iniciar a destruição tecidual (ARMITAGE, 1999).

A etiologia predominante é de micro-organismos gram-negativos, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Estes microrganismos possuem um arranjo de fatores de virulência que aumentam a

infectividade e capacidade destes de se multiplicarem e persistirem no periodonto. A patogênese da doença é mediada pela resposta do hospedeiro à presença destes microrganismos (VAN DYKE & SERHAN, 2003).

Com o aumento do desafio microbiano, seus produtos interagem com o epitélio gengival e induzem a expressão de moléculas de adesão e produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (PRESHAW & TAYLOR, 2011). Os vasos sanguíneos abaixo do epitélio afetado aumentam sua permeabilidade, expressão de moléculas de adesão e um gradiente de sinais quimioatraentes que guiam os leucócitos nos tecidos gengivais. Os neutrófilos migram através do epitélio juncional e sulco gengival. Com a persistência do processo inflamatório observa-se a formação de um infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo consistindo predominantemente de linfócitos T e macrófagos (DARVEAU, 2010). Os fibroblastos normalmente produzem uma variedade de colágeno, no entanto na periodontite ativa, os genes para colágeno são desativados, assim como os genes inibidores das metaloproteinases, já os genes que regulam as metaloproteinases são ativados, resultando na destruição de matriz extracelular e aumento do infiltrado celular inflamatório. A resposta imune adaptativa encontra-se sob o controle dos linfócitos T, que regulam a diferenciação de células B em plasmócitos e produção de anticorpos (GEMMELL et al., 2002).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DA PERIODONTITE

A periodontite crônica, anteriormente classificada como “periodontite crônica do adulto” ou “periodontite do adulto”, sendo alterada já que apesar de ser mais freqüente em adultos, pode acometer crianças e adolescentes em resposta ao acúmulo crônico de placa e cálculo (CASELI et al., 2006).

Alguns aspectos clínicos são característicos desta enfermidade, tais como: acúmulo de placa supra e subgengival, que é frequentemente associado com formação de cálculo, inflamação gengival, formação de bolsa, perda de inserção e perda de osso alveolar. A gengiva apresenta-se inchada exibindo alterações de cor que varia do vermelho-pálido

até magenta, sangramento espontâneo ou como resposta à sondagem. Pode ser encontrado exsudato inflamatório relacionado ao fluido gengival e supuração da bolsa. As profundidades das bolsas podem variar e as perdas ósseas podem ser horizontais e verticais, podendo levar a mobilidade dental nos casos mais avançados (CARRANZA et al., 2004).

O acúmulo de placa sobre as superfícies dento-gengivais é considerado o agente iniciador primário na etiologia da periodontite. O aumento de microrganismos gram-negativos no biofilme subgengival, especificamente de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, que são excepcionalmente virulentos e patogênicos ao periodonto, é frequentemente associado com perda de inserção e óssea contínua na periodontite crônica (CARRANZA et al., 2004).

Já a periodontite agressiva consiste numa doença de progressão rápida, relativamente rara e frequentemente grave, que na maioria dos casos caracteriza-se pela idade precoce de manifestação clínica e uma tendência familiar. O seu diagnóstico requer a exclusão da presença de doenças sistêmicas que possam acarretar manifestações periodontais. Além disso, observa-se também incompatibilidade entre a quantidade de depósitos microbianos e a gravidade da destruição periodontal (HEPP et al., 2007; LINDHE et al., 2010).

Fatores genéticos e imunológicos estão associados com a susceptibilidade do indivíduo à periodontite agressiva. Sabe-se que a intensidade da resposta imune está diretamente relacionada com a gravidade da periodontite, e que o polimorfismo genético pode influenciar diretamente na resposta do hospedeiro ao biofilme. Em busca de respostas, pesquisas vêm sendo realizadas em famílias, com a finalidade de se elucidar a contribuição genética na patogênese da doença. O polimorfismo da IL-1, citocina pró-inflamatória, tem sido relacionado com o aumento da destruição óssea e de tecido conjuntivo. Há também o aumento dos níveis de leucócitos periféricos e globulina sérica, de anticorpos reativos na presença de um número limitado de periodontopatógenos (MUÑOZ et al., 2010; SPANEMBERG et al., 2008).

A etiologia da doença periodontal considera três grupos de fatores que determinam

se a atividade da doença irá ocorrer, a susceptibilidade do hospedeiro, a presença de espécies patogênicas e ausência das chamadas “bactérias benéficas” (KESIC et al., 2008).

2.3 O PAPEL DE *Porphyromonas gingivalis* E SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA NA ETIOLOGIA DA PERIODONTITE CRÔNICA

Porphyromonas gingivalis anteriormente chamado de *Bacteroides gingivalis*, é um anaeróbio estrito, gram-negativo, que produz colônias de pigmentação negra, considerado um dos principais agentes etiológicos da doença periodontal e de sua progressão (LINDHE, 2010).

O estabelecimento deste microrganismo em uma infecção crônica é possível devido a sua capacidade para evadir ou subverter mecanismos de defesa do hospedeiro que buscam eliminá-lo (HAJISHENGALLIS, 2009). Alguns mecanismos de virulência têm sido identificados, como a cápsula de carboidrato presente em sua superfície externa que previne a opsonização pelo complemento e inibe a fagocitose e morte pelos neutrófilos. Os lipopolissacarídeos (LPS) são endotoxinas de membrana produzidas que podem inibir a quimiotaxia e consequente morte pelos leucócitos. Estes organismos produzem uma variedade de fatores de virulência, incluindo adesinas, endotoxinas, citotoxinas e as proteases que degradam imunoglobulina, fibras colágenas, complemento e ácido hialurônico (KESIC et al., 2008).

As fímbrias principal FimA, que funcionam como adesina para mediar a inserção da bactéria às células do hospedeiro, é composta de uma subunidade protéica, fibrilina, com uma massa molecular que varia de 41 a 45 KDa, dependendo da cepa. As gipapainas constituem enzimas responsáveis por atividades proteolíticas extracelulares e ligadas as células, assim como influenciam a aderência bacteriana às células epiteliais.

As hemaglutininas, quando expressadas na superfície celular podem promover a colonização por mediar a ligação da bactéria a receptores celulares humanos. Além disso, apresentam a função nutricional, por permitir a ligação da bactéria aos eritrócitos para obtenção de hemina para seu crescimento (LAMONT & JENKINSON, 1998). A

hemina corresponde a um grupo prostético de algumas proteínas biologicamente ativas do hospedeiro, tais como hemoglobina, mioglobina e citocromo, que transportam o ferro, um nutriente necessário, co-fator de várias enzimas como o citocromo, para uma ampla gama de funções metabólicas e de sinalização para os microrganismos. (GAO et al., 2010).

Estas bactérias existentes no biofilme vivem em ambientes sob limitação de nutrientes, com restrição de ferro livre ou heme. A captação de ferro a partir de hemina, tais como ferro e protoporfirina IX, é um importante mecanismo pelo qual *Porphyromonas gingivalis* e outras bactérias obtêm compostos para sua sobrevivência e estabilização na infecção (McKEE et al., 1986). O heme de hemoglobina é a fonte principal deste fator de crescimento no sulco gengival (LEWIS et al., 2006). Outra forma de suplementação é pelo seqüestro de ferro-porfirina de proteínas do hospedeiro como hemopexina, haptoglobina e soro albumina (SROKA et al., 2001). O sangramento como resultado do processo inflamatório gengival irá elevar as concentrações de hemina subgengivais e pode ser um fator que predispõe ao acúmulo de *Porphyromonas gingivalis* no sítio. Este, por sua vez, tem desenvolvido mecanismos que aumentam a disponibilidade de hemina. Atividade proteolítica, talvez em associação direta com proteínas heme-ligantes, irá degradar proteínas do plasma heme-isoladas do hospedeiro, tais como haptoglobulina e albumina (LAMONT & JENKINSON, 1998; SMALLEY et al., 2011).

Os microrganismos desenvolveram dois mecanismos de aquisição de hemina das proximidades: o primeiro envolve a síntese de receptores de membrana específicos capazes de promover contato direto do organismo com a fonte de hemina exógena, por exemplo, HmuR de *Porphyromonas gingivalis*; a segunda estratégia depende da secreção de moléculas capturadoras de hemina, responsáveis por captar a hemina livre ou de várias cargas, como por exemplo, HasA em *Serratia Marcescens* (GAO et al., 2010).

Diversas proteínas hemina ligantes, incluindo OMP26, OMP32, HBP35, Tlr, HmuR, HmuY e IhtB tem sido relatadas em culturas de *Porphyromonas gingivalis*. A grande maioria é expressa sob condições de limitação de hemina. Um dos sistemas de captação

em *Pg* é o locus HmuYRSTUV, compreendendo dois componentes chaves, HmuY e HmuR, ambas proteínas de membrana com baixa afinidade de ligação a heme. (GAO et al., 2010; SIMPSON et al., 2000).

HmuY é um receptor de membrana externo dependente de TonB envolvido no transporte do heme através da membrana externa, ou seja é uma lipoproteína heme-ligante associada com a membrana externa da célula bacteriana. Esta proteína apresenta uma estrutura única composta de uma cadeia β podendo ser funcional sob a forma de dímeros/tetrâmeros. O dímero HmuY capta o heme e isto leva a tetramerização sob oclusão dos sítios heme-ligantes. Assim, o tetrâmero HmuY pode proteger o heme de coletores (scavenger) do hospedeiro e entregá-lo ao HmuR. Uma vez ligado ao HmuR, o heme é translocado através da membrana externa dentro do periplasma com assistência de TonB e o transporte do heme ainda requer a presença de proteínas de ligação para escoltá-lo através do periplasma para o citoplasma. HmuY na forma associada com a membrana externa pode alojar o heme e proteger a célula bacteriana de danos induzidos pelo heme livre (OLCZAC et al., 2010; WÓJTOWICZ et al., 2009), capaz de catalisar formação de radicais livres (OLCZAC et al., 2006).

HmuY exerce um importante papel não somente na aquisição do heme mas também no acúmulo de biofilme em superfícies abióticas, o que representa um efeito significativo na infecção crônica, desafiando o sistema imune do hospedeiro e promovendo resistência ao tratamento antimicrobiano. Foi demonstrado que a expressão da proteína HmuY é aumentada em condições de baixo ferro/heme e também nestas condições observou-se o maior acúmulo de biofilme. Os dados mostraram que HmuY é uma proteína de superfície reconhecível pelo sistema imune durante a periodontite crônica e que a produção de anticorpos anti-HmuY pode inibir a formação de biofilme (OLCZAC et al., 2010).

Pela primeira vez, foi demonstrado o potencial imunogênico de HmuY de *Porphyromonas gingivalis*, por induzir altos níveis de IL-1 β , IL-10, IgG e IgG1 anti-HmuY e inibição da produção de IL-8 em pacientes com periodontite crônica, promovendo desta maneira o processo inflamatório e comprometendo o recrutamento de neutrófilos

(TRINDADE et al., 2012). Posteriormente verificou-se que a proteína HmuY também induz alta produção de IL-6 (TRINDADE et al., 2013).

HmuY foi capaz de estimular altos níveis de Bcl-2 por células T CD3+ obtidas de pacientes com periodontite crônica depois de 48 horas. Altos níveis de Bcl-2 podem prevenir apoptose celular, promovendo a permanência de células inflamatórias nos tecidos periodontais e conseqüentemente prolongando o processo de destruição tecidual, induzindo apoptose tardia destas, o que resultará na necrose celular e liberação de seu conteúdo, incluindo moléculas que agem promovendo resposta inflamatória (CARVALHO-FILHO et al., 2013).

2.4 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO AUTÓLOGAS

As proteínas de choque térmico (HSPs) estão entre as mais conservadas e imunogênicas compartilhadas entre eucariotos e procariotos. Em condições fisiológicas, estas são responsáveis pela manutenção da integridade e função de outras proteínas celulares quando as células são expostas a estímulos estressores, tais como hipóxia, isquemia, hiperoxia, anoxia, deficiência nutricional, infecção, exposição a carcinógenos, entre outros (KAUFMANN, 1990). Sob condições estressoras, é rapidamente induzida na célula a transcrição de genes HSP, por meio da sinalização de fatores de transcrição de proteína de choque térmico (HSFs), que se ligam ao elemento choque térmico (HSE) na região promotora do gene HSP resultando na posterior produção de HSP. Quando há uma expressão exacerbada da proteína na ausência de estressor, a mesma liga-se diretamente ao domínio de ativação HSF1 resultando na sua supressão (KHALIL et al., 2011).

HSPs são categorizadas sob famílias distintas, de acordo com seu peso molecular: pequenas HSPs (de 15 a 30 KDa), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100. Cada família de HSPs é composta por membros expressados constitutiva e/ou regulados de forma indutiva, sendo encontrados em diferentes compartimentos celulares. HSPs intracelulares são conhecidas por garantir o dobramento protéico na sua estrutura

terciária correta, incorporação de polipeptídeos dentro das membranas intracelulares ou no transporte de proteínas através destas membranas, enquanto que as extracelulares exercem uma função imunogênica, por meio de chaperonas complexadas a peptídeos antigênicos (KHALIL et al., 2011). HSPs fazem parte de um grupo chamado “chaperonas moleculares”, que recebem este nome por acompanharem, em condições metabólicas normais, proteínas desdobradas e polipeptídeos durante o transporte celular destes, permitindo que estas moléculas passem através de membranas e que sejam inseridas dentro de organelas celulares. Ajudam também a proteger estas proteínas e polipeptídeos quando sujeitos a estresse prevenindo o seu desdobramento e ligam-se a proteínas parcialmente dobradas ou desnaturadas prevenindo sua agregação, assim como, auxiliam no correto dobramento destas proteínas (CHANDRA et al., 2007).

Além do papel de manutenção da homeostasia celular, estas proteínas podem agir como moléculas sinalizadoras intercelulares, exercendo um papel na progressão do ciclo celular, na apoptose e estando envolvidas em alguns processos de doença (CAPELLO et al., 2008).

HSP60 é uma chaperonina mitocondrial que também pode ser detectada no citosol. Esta proteína está entre as famílias mais altamente conservadas com mais de 70% de homologia entre procariotos e humanos. Ela auxilia no dobramento de proteínas mitocondriais e facilita a degradação proteolítica de proteínas mal formadas ou desnaturadas. Para exercer esta função de chaperona ela interage com HSP10. Tem sido vinculada a indução e perpetuação de diversas doenças imunes, tais como, artrite reumatóide, diabetes, aterosclerose, câncer dentre outras (PARSELL & LINDQUIST, 1993; LI, et al., 2002; SEGAL et al., 2006; JEGO et al., 2013).

Tem sido relatado o papel de HSP60 tanto pró como anti-apoptótico. HSP60 citosólico inibe apoptose por sequestrar Bax, prevenindo sua translocação para membrana mitocondrial (TAKADA et al., 2010). Já HSP60 mitocondrial promove a maturação e consequente ativação de pro-caspase 3, podendo então levar à clivagem de

proteínas de reparo de DNA poli (ADP-ribose) polimerases, fragmentação de DNA e morte celular (LEE Y-H. et al., 2008). Em outro estudo, mostrou-se que HSP60 extracelular foi capaz de induzir apoptose em miócitos cardíacos, após a ligação deste ao miócito cardíaco, ocorrendo a ativação de NF- κ B, seguida pela liberação de citocromo C e de fator ativador de apoptose (AIF), resultando na clivagem de DNA e apoptose do miócito cardíaco (KIM et al., 2009).

Devido a sua alta conservação entre patógenos microbianos e sua capacidade de induzir resposta imune celular e humoral, HSP60 tem sido sugerida como possível candidato antigênico na periodontite. Foi demonstrado que HSP60 humano pode ser alvo de respostas autoimunes na periodontite devido ao mimetismo molecular com a homóloga GroEL de *Porphyromonas gingivalis* (YAMAZAKI et al., 2002). As células T ou anticorpos induzidos por HSP microbiano podem gerar reação cruzada com HSP humano correspondente, e iniciar uma resposta auto-imune (TABETA et al., 2000). O mecanismo imune inato ativado por HSP pode reforçar e até mesmo direcionar o tipo de resposta imune adaptativa para aquela proteína.

HSP são dotadas de atributos imunoregulatórios, tais como, a indução de tolerância às células T por HSPs autólogos; reconhecimento por receptores microbianos TLR (*toll-like receptors*) e outros ligantes receptores da imunidade inata; ativação diferencial das células dendríticas por HSP exógenos versus autógenos, levando à geração de uma resposta pró-inflamatória versus regulatória, respectivamente. Ativação de macrófagos e do sistema complemento por meio de anticorpos anti-HSP60. (RAJIAH & MOUDGIL, 2009).

Avaliando o potencial imunogênico da proteína de choque térmico purificados de tumores e células infectadas com vírus, mostrou-se sua capacidade de gerar uma resposta imune mediada por células T citolíticas mesmo na ausência de células T CD4+. A captação do complexo HSP-peptídeo é mediada por receptores específicos para membros individuais da família HSP que são expressos na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC). Esta ativação por HSP60 é mediada por proteínas conservadas como CD14 e receptores toll-like (TLR), trazendo imediatas consequências

para a resposta imune celular. A liberação de quimiocinas, como IL-8, recruta células T de órgãos linfóides e estas são então completamente ativadas pelo reconhecimento de fragmentos peptídicos processados de patógenos bacterianos e virais em um ambiente pró-inflamatório. Assim, HSP, pode agir como um iniciador da resposta adaptativa pelas células T. Conseqüentemente, HSP exerce um papel duplo no curso de ativação de células T, estimulando a secreção de citocinas por APC, aumentando a ativação de células T citolíticas através dos macrófagos ativados (MORÉ et al., 2001).

As proteínas de choque térmico associadas a peptídeos antigênicos gerados dentro das células fazem parte da via endógena de apresentação de antígeno por MHC classe I. HSP associado ao peptídeo exposto na superfície celular ou liberado das células, pelo estresse ou morte celular, é captado pelas células apresentadoras de antígeno resultando na reapresentação dos peptídeos às moléculas de MHC classe I, estimulando a secreção de citocinas pró-inflamatórias (LI et al., 2002; BINDER & SRIVASTAVA, 2005; PRAMOD et al., 1998).

HSP são importantes indutores de imunidade inata e antígeno-específica, exercendo um papel de “sinalizadores de perigo”, sendo pesquisado o seu uso em vacinas para infecções e câncer. Para infecções, podem ter um papel duplo, HSP derivado de patógeno e do hospedeiro pode ser empregado como adjuvante e o derivado de patógeno pode também ser usado como antígeno de vacina. No tratamento de tumores cancerígenos, são utilizados associados a peptídeo derivado do tumor, gerando assim imunidade específica somente para o câncer, reduzindo a possibilidade de escape tumoral a imunoterapia (SEGAL et al., 2006; JEGO et al., 2013). HSP60 endógenos, altamente expressados terapêuticamente ou exógenos, administrado como proteína ou gene tem potencial em terapia anticancerígena em vários mecanismos, seja pela repressão de vias anti-apoptóticas, ativação de mecanismos pró-apoptóticos e indução de HSP60 na superfície celular e/ou liberação extracelular ativando resposta imune antitumoral (CAPELLO et al., 2008)

3- OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar os níveis de HSP60 no sobrenadante do lisado celular de CMSP de pacientes com periodontite crônica sob estímulo da proteína recombinante rHmuY de *Porphyromonas gingivalis*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Comparar os níveis de HSP60 no sobrenadante de cultura do lisado celular de CMSP de portadores periodontite crônica com aqueles de CMSP de indivíduos sem a doença.
- Observar os níveis de HSP60 no sobrenadante de cultura do lisado celular de CMSP humanas em presença de rHmuY de *Porphyromonas gingivalis*.

4- METODOLOGIA

4.1 POPULAÇÃO E ÁREA DO ESTUDO

Foram convidados a compor a amostra os indivíduos encaminhados para atendimento no Centro de Especialidades Odontológicas do bairro da Federação em Salvador-BA. Os participantes receberam todas as devidas informações sobre a pesquisa e, posteriormente, preencheram os formulários para obtenção e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE I), permanecendo uma cópia com os mesmos. Esta pesquisa recebeu o parecer de aprovação do comitê de ética nº 79791(ANEXO 1).

4.2 DESENHO DO ESTUDO

Foi desenvolvido um estudo piloto observacional. Os dados avaliados do presente estudo são provenientes de um estudo maior cujo objetivo é investigar o papel de antígenos de *Porphyromonas gingivalis* na patogênese da periodontite.

4.3 PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM

4.3.1 Tamanho da Amostra deste Estudo Piloto

O tamanho da amostra do presente estudo piloto foi de 27 indivíduos, fazendo parte do grupo com periodontite crônica (PC), 11 participantes e do grupo sem periodontite (SP), 16 participantes.

4.3.2 Composição dos grupos em estudo

A busca ativa dos voluntários participantes dos grupos em comparação foi realizada a partir de um levantamento do atendimento de periodontia semanal realizado no Centro de Especialidades Odontológicas da Federação, Salvador, Bahia,

Brasil. Os critérios avaliados pela anamnese (APÊNDICE II) e considerados para a não inclusão dos voluntários neste estudo piloto foram: história de doenças sistêmicas, gestação atual, tratamento periodontal anterior, fumo atual ou anterior, uso de antibióticos e antiinflamatórios, respectivamente, nos seis e dois meses anteriores à coleta. Os participantes foram classificados de acordo com o diagnóstico periodontal, em grupo com periodontite crônica e grupo sem periodontite, conforme descrito no item 4.5.

4.4 AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO PERIODONTAL

A avaliação periodontal deste estudo contemplou os descritores clínicos mencionados abaixo. Além desta avaliação, o exame clínico bucal ainda incluiu registro de número de dentes presentes, com lesão cariosa, perdidos e com restaurações, bem como qualquer aspecto observado que não se encontrava dentro dos limites da normalidade (APÊNDICE III).

4.4.1 Exame de profundidade de sondagem: realizado a partir da medida da distância entre a margem gengival e o ponto mais apical sondável, utilizando uma sonda milimetrada do tipo Williams (Trinity, São Paulo). Foi registrada em 6 diferentes sítios em cada dente, conforme descrito por Pihlstrom et al. (1981), que consiste em quatro medidas proximais (nos ângulos méso-vestibular, méso-lingual, disto-vestibular e disto-lingual), uma na região médio-vestibular e uma na região médio-lingual. A sonda foi introduzida delicadamente no sulco gengival de cada face, paralela ao longo eixo do dente, até encontrar uma resistência tecidual mínima à penetração, sendo então a marcação numérica, em milímetros, registrada em ficha própria. Quando a margem gengival estava localizada entre duas marcas da sonda, adotou-se o valor inteiro da marca mais alta e, quando a margem se encontrava numa posição equidistante de duas marcas, foi considerada a mais alta.

4.4.2 Índice de recessão/hiperplasia: As medidas da altura da margem gengival em relação à junção cimento-esmalte foram registradas em seis locais para cada dente conforme descrito anteriormente na medida de profundidade de sondagem de sulco/bolsa e sendo utilizadas as mesmas sondas milimetradas. No caso de uma recessão gengival, o valor em milímetros foi considerado positivo. Quando a margem gengival estava localizada coronalmente à junção cimento-esmalte, ou seja, no caso de uma hiperplasia gengival, o valor em milímetros da margem gengival à junção cimento-esmalte foi considerado negativo. Estas medidas foram obtidas com o posicionamento da ponta da sonda na margem gengival e o valor, em milímetros, a partir deste ponto até a junção cimento-esmalte, foi imediatamente anotado em ficha própria. Com a sonda milimetrada paralela ao longo eixo do dente e as superfícies dentárias secas com jato de ar, estabeleceu-se uma sequência, como já descrito no item anterior, assim como os procedimentos de aproximação numérica quando a junção cimento-esmalte ficou localizada entre as marcas da sonda.

4.4.3 Nível de Inserção Clínica: A medida de inserção clínica (RAMFJORD, 1959) foi obtida através da somatória dos valores da profundidade de sondagem de sulco/bolsa e medidas de recessão ou hiperplasia gengivais. No caso de uma recessão, a perda de inserção clínica foi a soma dos valores de profundidade de bolsa e da medida de recessão. No caso de uma hiperplasia gengival, foi a somatória do valor positivo da profundidade de bolsa com o valor negativo dado à hiperplasia, ou seja, representando na prática a subtração do valor da hiperplasia daquele atribuído à profundidade de sondagem. Finalmente, seis medidas de perda de inserção clínica foram obtidas: méso-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, médio-lingual e méso-lingual.

4.4.4 Índice de Sangramento à Sondagem: Avaliou-se a condição gengival através do índice de sangramento (AINAMO; BAY, 1976) usando o critério da presença de sangramento após a sondagem. Após a secagem das superfícies dentárias e medição da

profundidade de sondagem de sulco/bolsa, observou-se depois de passados 10 segundos da remoção da sonda, a presença ou não de sangramento. Quando observado sangramento subsequente à sondagem em determinada face, e o registro foi feito na ficha. A proporção de faces sangrantes em relação ao total de faces examinadas foi calculada, determinando assim o índice de sangramento para cada indivíduo.

4.5 DIAGNÓSTICO PERIODONTAL

Foram considerados portadores de periodontite crônica aqueles participantes que apresentaram pelo menos quatro dentes com, no mínimo, um sítio, com profundidade de sondagem maior ou igual a 4mm, perda de inserção maior ou igual a 3mm e sangramento à sondagem, no mesmo sítio (GOMES-FILHO et al., 2007).

O caráter crônico da doença foi determinado de acordo com a Academia Internacional de Periodontia (ARMITAGE, 1999), como se segue: periodontite crônica, localizada (menos de 30% de perda de inserção clínica) e generalizada (mais de 30% de perda de inserção clínica);

Desse modo, os participantes do presente estudo foram divididos em dois grupos de acordo com a condição periodontal: **Grupo com Periodontite Crônica (CP)** e **Grupo sem Periodontite (SP)**.

4.6 PREPARO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE HmuY

A proteína recombinante HmuY de *Porphyromonas gingivalis* A7436, de 23kDa, foi obtida e purificada utilizando-se *Escherichia coli* para a sua expressão no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Biotecnologia da Universidade de Wrocław, Polônia. A sua pureza foi confirmada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes na presença de sodium dodecilsulfato (SDS-PAGE) e *Western Blotting*.

4.7 COLETA DE SANGUE E SEPARAÇÃO DE CMSP

O sangue dos indivíduos foi coletado num volume de 30mL, por punção venosa na fossa ante-cubital com tubo tipo Vacutainer estéril (BD-SP), em tubos heparinizados.

O sangue coletado foi diluído em salina tamponada com fosfato (STF), aplicado a uma camada de FICOLL e submetido a centrifugação. O anel de interface enriquecido de células mononucleares de sangue periférico foi coletado, lavado e ressuspenso em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RMPI), para contagem em contador de células (CELM).

4.8 CULTIVO CELULAR

As CMSP foram distribuídas em placas para cultivo celular em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) adicionada a 1% de antibiótico/antimicótico e 10% de soro fetal bovino. Os antígenos foram adicionados em diferentes concentrações: rHmuY: 2,5 µg/ml e Pokeweed: 5 µg/ml, anteriormente padronizadas no laboratório.

O cultivo foi realizado a 37°C, sob atmosfera umidificada e em presença de CO₂. Após 48 horas as amostras foram coletadas.

4.9 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO ELISA PARA DETECÇÃO DO HSP60

As concentrações de HSP60 nos sobrenadantes das culturas de células foram mensuradas usando-se kits disponíveis comercialmente (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA). Os ensaios foram realizados usando-se placas de poliestireno de alta adsorção com 96 poços de fundo chato (SKC-109A - Anti-HSP60, Immunoassay Plate). As amostras foram diluídas conforme padronização prévia em diluente de reagente bem como todas as demais etapas foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. A densidade ótica foi determinada em Leitora de ELISA (ELx 800 – Bio-Tek) ajustada para um comprimento de onda na faixa de 450 nm.

4.10 PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE DE DADOS

Inicialmente, foi efetuada uma análise descritiva para caracterização dos grupos

participantes do estudo. Os dados relacionados às covariáveis dicotômicas foram testados, após a obtenção das frequências simples e relativa, com o teste de Qui-quadrado de Pearson. As medidas de tendência central e dispersão foram utilizadas para as variáveis intervalares, e em seguida os dados foram comparados com o teste T de Student ou Mann-Whitney U, a depender da sua distribuição, testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os dados gerados com níveis de HSP60 detectados nos grupo SP e PC foram analisados por meio do teste T de Student, enquanto que as comparações entre as três condições de cultivo foram realizadas pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-hoc de Tukey. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5- RESULTADOS

Foram convidados a participar do presente estudo piloto cerca de 600 indivíduos. Retirando-se os que se recusaram e os que não atenderam aos rigorosos critérios de não inclusão, 27 foram incluídos no estudo. O grupo com periodontite crônica (**PC**) foi composto por 11 participantes (40,7%), enquanto que o grupo sem periodontite (**SP**) foi composto por 16 participantes (59,3%). A média de idade dos participantes do grupo **PC** foi de 39,8 anos \pm 7,5 anos, com limite mínimo de 25 anos e máximo de 48 anos. Já a média de idade das participantes do **SP** foi de 38 anos \pm 11,5 anos, com limites mínimo e máximo de 20 anos e 57 anos, respectivamente. Com relação ao sexo dos voluntários, entre os participantes do grupo **CP**, 7 (63,6%) eram do sexo feminino e 4 (36,4%) eram do sexo masculino. Já no grupo **SP**, 9 (56,3%) eram do sexo feminino e 7 (43,7%) do sexo masculino. Não houve diferença estatisticamente significativa na média da idade ($p=0,650$) e na proporção de indivíduos do sexo masculino ou feminino ($p=0,701$) entre os dois grupos, demonstrando que ambos foram homogêneos no que diz respeito a estas duas covariáveis (Tabela 1).

No que se refere aos aspectos relacionados à condição periodontal, como já era esperado, houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em todos os descritores clínicos avaliados. Ainda na tabela 1 observa-se que o grupo **PC** apresentou um percentual médio de sítios com sangramento à sondagem de 29,9 enquanto que o valor para o grupo **SP** foi de 8,6 ($p=0,002$); o percentual médio de sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 4mm foi significativamente superior ($p=0,001$) no grupo **PC** (14,16%) quando comparado ao grupo **SP** (1,27%). Com relação ao nível de inserção clínica, o grupo **PC** apresentou percentuais médios de NIC maior ou igual a 3mm ($p=0,000$) e NIC maior ou igual a 5mm ($p=0,024$) de 57,1 e 9,2, respectivamente, enquanto os percentuais para o grupo **SP** foram de 20,3 e 1,6, respectivamente.

Os níveis de HSP60 nas CMSP foram dosados por ELISA e as diferenças entre os grupos foram analisadas de acordo com o estímulo utilizado durante a cultura. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos **PC** e **SP** quando as células foram cultivadas sem estímulo ($p=0,090$), em presença do mitógeno *Pokeweed* ($p=0,762$) ou da proteína rHmuY ($p=0,261$). Entretanto, pode-se perceber no gráfico 1 que as células dos voluntários sem periodontite, quando cultivadas apenas com o meio de cultura, sem estímulo, apresentaram maiores níveis de HSP60 quando comparadas com as células dos portadores de periodontite cultivadas sob as mesmas condições.

Para analisar as possíveis diferenças entre as três formas de cultivo das CMSP, as amostras de todos os pacientes foram então agrupadas. Assim, as células cultivadas em presença do mitógeno *Pokeweed* apresentaram níveis superiores de HSP60 quando comparados aos daquelas cultivadas em presença de rHmuY ($p=0,03$). Não foram observadas diferenças nos níveis de HSP60 entre as células cultivadas com o mitógeno *Pokeweed* e as células cultivadas sem antígeno/mitógeno nem entre estas e as células cultivadas com rHmuY.

Tabela 1: características gerais dos participantes do grupo sem periodontite (**SP**) e com periodontite (**PC**). Salvador, Bahia, Brasil, 2014 (n=27).

	GRUPO SP N=16	GRUPO PC N=11	p*
Idade (anos) (média±DP)	38± 11,5	39,8± 7,5	0,65
Sexo (feminino/masculino)	9/7	7/4	0,701
% sítios com SS (média±DP)	8,6±11,1	29,9±16,3	0,002
% sítios com PS≥4mm (média±DP)	1,27±1,5	14,16±9,1	0,001
% sítios com NIC≥3mm (média±DP)	20,3±14,3	57,1±20,6	0,000
% sítios com NIC≥5mm (média±DP)	1,6±2,3	9,2±9,4	0,024

* Valor de p: nível de significância ≤ 0,05; Para todos foram feitos teste T Student;
Para sexo, teste quiquadrado e demais teste Mann-Whitney.

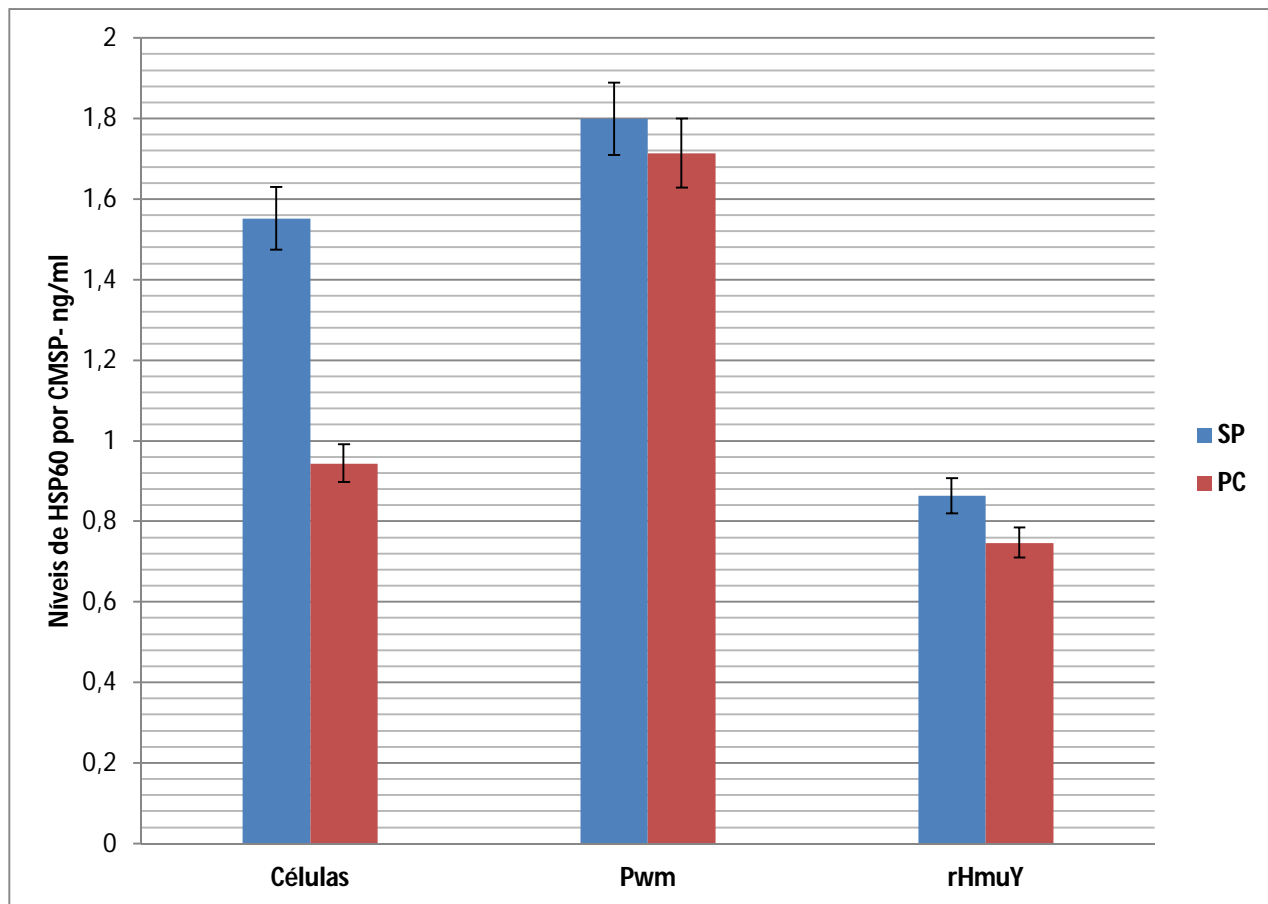


Gráfico 1: níveis de HSP60 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de voluntários sem periodontite (**SP**) e com periodontite crônica (**PC**) expostos a diferentes condições: sem estímulos de antígenos/mitógenos, estimuladas com *Pokeweed* (PWN) e com rHmuY.

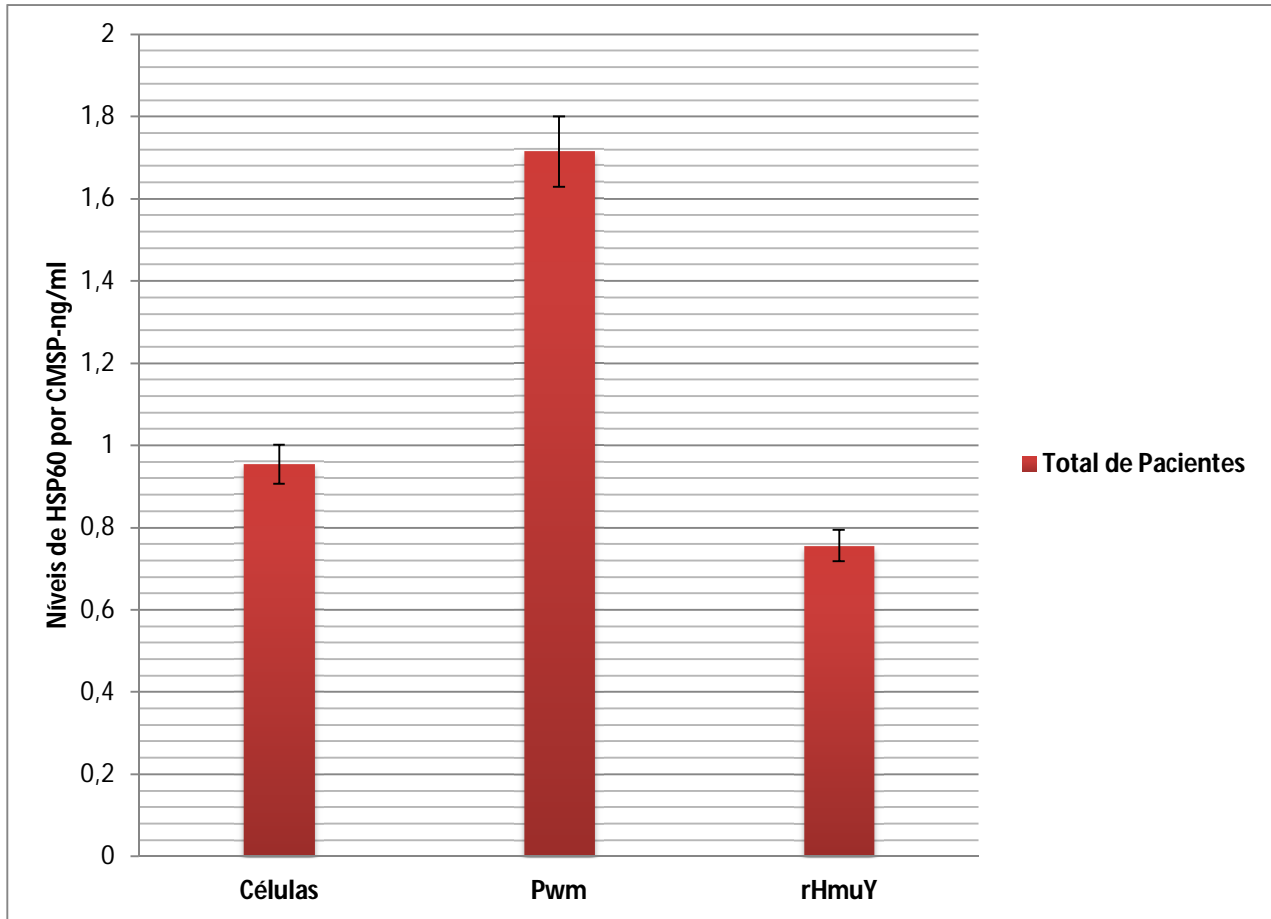


Gráfico 2: níveis de HSP60 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) do total de pacientes exposto a diferentes condições: células sem antígenos/mitógenos; estimuladas com PWNe com rHmuY.

6- DISCUSSÃO

A literatura é bastante vasta com relação ao papel das HSP em diversos agravos, como doenças inflamatórias cardiovasculares, intestinais, injúria da isquemia/reperfusão, artrite reumatoide, diabetes e principalmente no câncer (RAJAHIA & MOUDGIL, 2009). No entanto, o estudo do papel de uma HSP humana na patogênese da periodontite é escasso. Muitos trabalhos abordam HSP de patógenos, como *Porphyromonas gingivalis*, e sua homologia com a proteína humana, com a consequente possibilidade de produção de anticorpos anti-HSP humana pelo hospedeiro, como uma forma de reação cruzada. (CHOI et al., 2011). No presente estudo piloto, objetivou-se verificar a influência de outra proteína da bactéria, HmuY, sobre os níveis de HSP60 por células humanas. Trata-se de uma proteína captadora de ferro (McKEE et al., 1986) que atua na resposta imune induzindo a produção de IL-10 e IL-1 β e inibindo a produção de IL-8 (TRINDADE et al., 2012a), mas cujo papel como fator de virulência ainda precisa ser melhor elucidado.

Quando as células de indivíduos com periodontite crônica foram cultivadas com o mitógeno ou com a proteína recombinante HmuY, os níveis de HSP60 foram semelhantes aos apresentados pelas células dos indivíduos que não possuíam os sinais clínicos da doença: o mitógeno induziu altos níveis, enquanto que na presença da proteína rHmuY observou-se uma diminuição dos mesmos em comparação com as células cultivadas sem estímulo.

O aumento na produção de HSP60 nas células cultivadas com mitógeno foi anteriormente relatada por Pockley et al., 1999. Sabe-se que a lectina *Pokeweed* utilizada neste experimento é um ativador policlonal de linfócitos (SHAROM, 2007), que induz a proliferação celular. Por outro lado, a proteína rHmuY inibe a proliferação de CMSP e tem a capacidade de induzir a morte celular por apoptose tardia e necrose (TRINDADE et al., 2012b).

A falta de capacidade em distinguir os indivíduos sadios e doentes considerando os níveis de HSP60 pode ter sido uma consequência do pequeno tamanho da amostra, que não favoreceu o poder da análise. Sabe-se também que a HmuY é um receptor de ferro cuja ação é necessária em microambientes desfavoráveis para o hospedeiro (WÓJTOWICZ et al., 2009; OLCZAK et al., 2010), ou seja, onde as concentrações deste elemento estejam baixas a ponto dos receptores constitutivos, como as gingipaínas (LEWIS et al., 1999; SROKA et al., 2001), não conseguirem a sua captação. Assim, por não ser uma proteína constitutiva da bactéria, como é a HSP60 não é possível assegurar que a presença de HmuY durante a infecção natural nos portadores de periodontite crônica tenha sido alta o bastante para determinar uma diferença na resposta do hospedeiro na infecção secundária simulada pela cultura.

Vale salientar também que as interações moleculares ocorrem preferencialmente de forma parácrina (GEMMELL et al., 2002), na tentativa de conter a infecção no ambiente periodontal. Isto se confirma na boa saúde sistêmica dos indivíduos portadores de periodontite, apesar da fonte crônica de infecção. Assim, os efeitos desta infecção podem não ter sido pronunciados nas células do sangue periférico. Outras abordagens utilizando fluido gengival e saliva seriam necessárias para o estudo destas interações.

Este estudo mostrou pela primeira vez que as células mononucleares de sangue periférico extraídas de humanos que não possuem periodontite apresentam níveis de HSP60 mais elevados que aquelas extraídas de portadores de periodontite crônica. Embora sem significância estatística, este achado tem grande importância clínica, uma vez que as proteínas de choque térmico, em particular HSP60, têm sido apontadas como alvos terapêuticos, podendo apresentar função anti-apoptótica relacionada à sua localização mitocondrial (SARANGI et al., 2013; CHANDRA et al., 2007). Todas as células procarióticas e eucarióticas contêm uma proteína de choque térmico com massa molecular de 60 KDa, que exerce um importante papel citoprotetor, atuando no enovelamento e montagem de proteínas importadas para a mitocôndria (PARSELL &

LINDQUIST, 1993). HSP60, codificada no núcleo, é constitutivamente expressa e direcionada para mitocôndria estando presente também em soro de indivíduos normais (POCKLEY et al., 1999).

Num processo infeccioso, patógenos liberam toxinas que desencadeiam o processo inflamatório, assim como o hospedeiro responde a estas toxinas, estimulando TNF, INF- γ , entre outros mediadores pró-inflamatórios. As proteínas de choque térmico intracelulares tem uma ação citoprotetora, como foi observado para HSP70 que foi capaz de proteger macrófagos infectados com *Salmonella choleraesuis* da morte celular induzida por TNF- α (KIMURA et al., 1998).

O acúmulo de proteínas de choque térmico, seja de maneira fisiológica, seja por abordagens terapêuticas, pode proteger o organismo de várias condições patológicas, como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, sepse, infecções virais, trauma, doenças neurodegenerativas, artrite e diabetes (TYTELL E HOOPER, 2001). Este trabalho foi pioneiro ao buscar o conhecimento do papel destas proteínas na tolerância ao estresse causado pela infecção bacteriana na periodontite, tentando elucidar diversos questionamentos relacionados à patogênese da doença. E a partir daí, em estudos futuros, avaliar seu potencial como ferramenta para intervenções terapêuticas que maximizem a preservação da integridade celular.

7- CONCLUSÕES

De acordo com o método empregado neste estudo e diante de suas limitações, conclui-se que:

- É possível que a expressão de HSP60 na célula humana exerça um papel protetor contra a periodontite, haja vista os seus níveis diminuídos nos portadores da doença em relação aos não doentes.
- HmuY de *Porphyromonas gingivalis* não altera a produção de HSP60 em CMSP humanas.
- O mitógeno *Pokeweed* tem a capacidade de aumentar a produção de HSP60 em CMSP.

8- REFERÊNCIAS

- AINAMO J & BAY I. Periodontal indexes for and in practice. Tandlaegebladeer, v. 80, n. 5, p. 149-152, 1976.
- ANDRIAN E, GRENIER D & ROUABHIA M. *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis. JDentRes, vol. 85, p. 392-403, 2006.
- ARMITAGE G. The pathogenesis of periodontal diseases. J periodontal, vol. 70, p. 457-470, 1999.
- BEREZOW AB & DARVEAU RP. Microbial shift and periodontitis. Periodontology 2000, Vol. 55, p. 36-47, 2011.
- BINDER RJ & SRIVASTAVA P.K. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8⁺ T cells. Nature Immunology, vol. 6, n.6, 2005.
- CAPELLO F et al. HSP60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. Cancer Biology & Therapy, vol.7, n.6, p. 801-809, 2008.
- CARVALHO-FILHO et al. *Porphyromonas gingivalis* HmuY stimulates expression of Bcl-2 and Fas by human CD3⁺ T cells. BMC Microbiology, vol. 13, n. 206, 2013.
- CARRANZA F.A.; NEWMAN, M.G.; TAKEY, H.H. Periodontia Clínica. **Guanabara Koogan**, 9^a ed., 2004.
- CASELI C.Z.; WEIDLICH P; MIRANDA L.A. Periodontite crônica em paciente adulto jovem: relato de caso clínico. Revista Periodontia, v.16, n.2, p. 5-13, 2006.
- CHANDRA D, CHOY G & TANG DG Cytosolic Accumulation of HSP 60 during apoptosis with or without Apparent Mitochondrial Release: Evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3. J. Biol. Chem., vol. 282, p.31289-31301, 2007. CHOI J et al. Identification of immunoreactive epitopes of the *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein in periodontitis and atherosclerosis. Journal of Periodontal Research. V. 46, n. 2, p. 240-245, april, 2011.
- DARVEAU RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. Nature reviews Microbiology, vol.8, p. 481-490, 2010.
- GAO J, NGUYEN K & HUNTER N. Characterization of a hemophore-like protein from *Porphyromonas gingivalis*. The Journal of Biological Chemistry, vol. 285, n. 51, p. 40028-40038, 2010.
- GEMELL E, YAMAZAKI K & SEYMOUR GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocyte response. Crit. Rev. Oral Biol. Med. vol.13, p.17-34, 2002.

- GOMES-FILHO IS et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity low birth weight. J periodontol, v. 34, p.957-963, 2007.
- HAJISHENGALLIS G. *Porphyromonas gingivalis* host interactions: open war or intelligent guerilla tactics? Microb Infect., vol. 11, p. 637-45, 2009.
- HEPP V et al. Periodontite agressiva: relato de casos e revisão de literatura. Rev Clín Pesq Odontol, Taubaté, v. 3, n. 1, p. 23-31, 2007.
- JEGO G et al. Targeting heat shock proteins in cancer. Cancer Letters, vol. 332, p. 275-285 2013.
- KAUFMANN SHE. Heat Shock Proteins and Immune Response. Immunology Today, Vol. 11, p. 129-136,1991.
- KESIC L et al. Microbial etiology of periodontal disease–mini review. Facta Universitatis Series: Medicine and Biology, vol.15, n.1, p.1-6, 2008.
- KHALIL AA et al. Heat Shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets? Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1816, p. 89-104, 2011.
- KIM YS. Increased circulating heat shock protein 60 induced by menopause, stimulates apoptosis of osteoblast-lineage cells via up-regulation of toll-like receptors. Bone, vol. 45, p. 68-76, 2009.
- KIMURA Y et al. The regulatore role of heat shock protein-70 reactive CD4+ T Cells during rat listeriosis. International Immunology, vol. 10, n. 2, p. 117–130, 1998.
- LAMONT R J & JENKINSON H F. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol Mol Biol Rev., vol. 62, p. 1244-1263, 1998.
- LEE Y-H et al. Differential effect of oxidative stress on the apoptosis of early and late passage human diploid fibroblasts: implication of heat shock protein 60. Cell Biochemistry and function, vol. 26, p. 502-508, 2008
- LEWIS PJ et al. Hemolglobinase Activity of the Lysine Gingipain Protease (Kgp) *Prophyromonas gingivalis* w83. Journal of Bacteriology, p. 4905-4913, 1999.
- LEWIS JP et al. Transcriptional organization, regulation and role of the *Porphyromonas gingivalis* W83 hmu haemin-uptake locus. Microbiology, vol 152, p. 3367-3382, 2006.
- LI et al. Roles of Heat-Shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. Currrent Opinion in Immunology, vol.14, 45-51, 2002.
- LINDHE, J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral , **Guanabara-Koongan**,ed. 5, 2010.
- MCKEE AS et al. Effect of hemin on the physiology and virulence of *Bacteroides gingivalis* W50.Infect Immun., vol. 52, n.2, p. 349-355, 1986.
- MORÉ SH et al. Eukaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive imune responses: HSP60-mediated activation of cytotoxic T cells. International Immunology, vol. 13, n. 9, p. 1121-1127, 2001.
- MUNÕZ MA et al. Aspectos genéticos e imunológicos da periodontite agressiva. RSBO. Revista Sul-Brasileira de Odontologia, v. 7, p. 90-94, 2010.

- NEWMAN MG, TAKEI H & CARRANZA FA. *Periodontia Clínica*. 9a ed., Guanabara Koogan, 2004.
- 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 expression and Purification*, vol.49, p. 299-306, 2006.
- OLCZAK et al. Species Specificity, surface exposure, protein expression, immunogenicity, and participation in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* HmuY. *BMC Microbiology*, vol. 10, n. 134, 2010.
- PARSELL & LINDQUIST. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev. Genet.*, vol. 27, p. 437-496, 1993.
- PASTER BJ. Bacterial Diversity in Human subgingival plaque. *J. Bacteriol.*, vol. 183, n.12, 2001.
- PIHLSTROM B, ORTIZ-CAMPOS C, MCHUGH R. A randomized four-year study of periodontal therapy. *J Periodontol*1981;52:227-42.
- POCKLEY A et al. Identification of human heat shock protein 60 (HSP60) and anti-HSP60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress & Chaperones*, vol.4, n.1, p. 29-35, 1999.
- PRAMOD K et al. Heat Shock Proteins Come of Age: Primitive Functions Acquire New Roles in an Adaptive World. *Immunity*, vol. 8, p. 657-665, 1998.
- PRESHAW PM & TAYLOR J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol*, vol.38 (suppl.11), p. 60-84, 2011.
- WÓJTOWICZ H et al. Unique Structure and Stability of Hmuy, a Novel Heme-Binding Protein of *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS Pathog* VOL.5, N.5, 2009.
- RAJAIAH R & MOUDGIL KD. Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity. *Autoimmun Rev.*, vol 8, n.5, p. 388-393, 2009.
- RAMFJORD SP. Indices for prevalence and indice of periodontal disease. *J. Periodontol*, v.30, n.1, p.51-59, 1959.
- ROCHA DM, ABDALLAH EYA, CEZÁRIO ES, ABREU FAM, COSTA FO. Periodontite agressiva: uma visão histórica e crítica sobre os sistemas de classificação. *Rev Periodontia*, v.1, p.11-15 2007.
- SARANGI U et al. HSP60 Chaperonin Acts as Barrier to Pharmacologically Induced Oxidative Stress Mediated Apoptosis in Tumor Cells with Differential Stress Response. *Drug Target insights*, vol. 7, p. 35-51, 2013.
- SEGAL et al. Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer. *Drug Discovery Today*, v. 11, n. 11/12, 2006.
- SHAROM N. Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem.*, vol. 282, p. 2753-2764, 2007.
- SIMPSON W, OLCZAK T & GENCO CA. *Characterization and expression of HmuR, a TonB-dependent hemoglobin receptor of Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* vol.182,n. 20, p. 5737–5748, 2000.

- SMALLEY JW et al. HmuY Haemophore and Gingipain Proteases Constitute a Unique Syntrophic System of Haem Acquisition by *Porphyromonas gingivalis*. PLoS ONE, vol.6, n.2, 2011.
- SOCRANSKY S & HAFFAJJE AD. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000, vol.38, p. 135-187, 2005.
- SPANEMBERG JC et al. Aspectos clínicos da periodontite agressiva: revisão. Journal of Dental Clinical and Research, v. 4, p. 183-189, 2008.
- SROKA A, et al. Degradation of Host Heme Proteins by Lysine- And Arginine-Specific Cysteine Proteinases (Gingipains) of *Porphyromonas gingivalis*. Journal of Bacteriology, vol. 183, p. 5609-5616, 2001.
- TABETA K et al. Elevated humoral immune response to heat shock protein 60 (HSP 60) family in periodontitis patients. Clin Exp Immunol, vol 120, p. 285-293, 2000
- TAKADA M et al. Overexpression of a 60-KDa heat shock protein enhances cytoprotective function of small intestinal epithelial cells. Life Sciences, vol. 86, p. 499-504, 2010.
- TRINDADE *et al*, Induction of interleukin (IL) – I β , IL-10, IL-8 and Immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. J Periodont Res vol.47, p. 27-32, 2012a.
- TRINDADE et al., *Porphyromonas gingivalis* antigens differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. Archives of oral biology, 57: 314-320, 2012b.
- TRINDADE et al., *Porphyromonas gingivalis* Hmuy – Induced Production of Interleukin-6 and IL-6 Polymorphism in Chronic Periodontitis. J Periodontal, vol. 84, p. 650-655, 2013.
- TYTELL M & HOOPER PL. Heat Shock proteins: new Keys to the development of cytoprotective therapies. Emergin Therapeutic Targets, vol. 5, n. 2, p. 267-287, 2001.
- VAN DYKE TE & SERHAN CN. Resolution of inflammation: a new paradigma for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. J. DENT Res, vol.82, n. 82, 2003.
- YAMAZAKI K et al. Accumulation of Human Heat Shock Protein 60-Reactive T Cells in the Gingival Tissues of Periodontitis Patients. Infect. Immun., vol. 70, n.5, 2002.

APÊNDICES E ANEXO

APÊNDICE 1:

PROJETO: Avaliação da expressão e produção de proteínas de choque térmico autólogas em portadores de periodontite estimuladas por antígenos de *Porphyromonas gingivalis*.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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. Pergunte-nos se houver qualquer coisa que não esteja clara ou se precisar de mais informações.

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 comprometimento 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 fatores de risco desta doença, 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: Avaliar a expressão e produção de proteínas de choque térmico autólogas em células mononucleares de sangue periférico de pacientes portadores de periodontite crônica e agressiva sob estímulos antigênicos de *Porphyromonas gingivalis*. Para tanto 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 do braço (exame de sangue) pelos pesquisadores participantes. Todo o material coletado será depois de feitos os exames necessários para este projeto, serão jogados fora. 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. 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 dentistas envolvidos na pesquisa, juntamente com os estudantes de Odontologia que ajudarão no projeto, realizarão o seu tratamento periodontal. Vale ressaltar que a qualquer momento, você poderá fazer perguntas sobre esta pesquisa com a garantia de que estas serão respondidas, tendo a liberdade de abandonar a pesquisa **sem prejuízo para si, podendo** 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 em qualquer das atividades de extensão do curso de Odontologia da UEFS. Os dados obtidos neste estudo, bem como fotografias que possam ser tiradas, 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). Caso ocorram danos à sua saúde, causados diretamente pela pesquisa, o mesmo será interrompido e os pesquisadores farão os encaminhamentos necessários. 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 a pesquisadora Ana Carla Montino Pimentel no telefone (75) 31618112 (NUPPIIM- UEFS).

Então, estando de acordo, assinam:

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do pesquisador

Assinatura da testemunha

Local e Data: _____

**Soraya Castro Trindade: BR-116, quilômetro 3, avenida Universitária, sem número,
NUPPIIM, Campus Universitário - Feira de Santana- Bahia**

ATENÇÃO: a sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de denúncia pelo não cumprimento do que foi acordado.

APÊNDICE 2:

Ficha de Anamnese

INFORMAÇÕES

GERAIS

Nome do Paciente	
Endereço	
Telefone	

Data de Nascimento				Idade		Sexo		
Ocupação atual							Local de Trabalho	
Ocupação anterior							Tempo de atividade	

HÁBITOS DE VIDA

Fumo		Sim		Não	Tipo			N. cig./dia		meses	
Álcool		Sim		Não	Tipo			Anos			
Drogas		Sim		Não	Tipo						

ANTECEDENTES MÉDICOS

Alergias		Sim		Não	Tipo					anos	
Anemia		Sim		Não	Tipo					anos	
Hipertensão Arterial		Sim		Não	Compensada		Sim			Não	
Hipotensão Arterial		Sim		Não	Compensada			Sim			Não
Válvulas Artificiais		Sim		Não	Tipo						
Problemas Valvares		Sim		Não	Tipo						
Endocardite Bact.		Sim		Não							
Ponte Safena		Sim		Não							
Infarto do Miocárdio		Sim		Não							
Marcapasso		Sim		Não							anos
Angina		Sim		Não	Compensada		Sim			Não	
Diabete Tipo I		Sim		Não	Compensada		Sim			Não	
Diabete Tipo II		Sim		Não	Compensada			Sim			Não
Hepatite		Sim		Não	Compensada		Sim			Não	
Epilepsia		Sim		Não	Compensada		Sim			Não	
Dist. Coagulação		Sim		Não	Compensada			Sim			Não
Leucemia		Sim		Não	Compensada		Sim			Não	
Tuberculose		Sim		Não	Compensada		Sim			Não	

Arteriosclerose		Sim
Osteoporose		Sim
Portador HIV		Sim
Portador HTLV		Sim
Neoplasias		Sim
Radioterapia		Sim
Transplantado		Sim
Leishmaniose		Sim
Equistossomose		Sim
Hipertireoidismo		Sim
Hipotiroidismo		Sim
Lupus eritematoso		Sim
Artrite Reumatóide		Sim
Febre Reumática		Sim
Doença de Crhon		Sim
Colite Ulcerativa		Sim
Malária		Sim
Herpes		Sim

	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não
	Não

Compensada		Sim		Não
Compensada	Sim		Não	
Em Tratamento	Sim		Não	
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento	Sim		Não	
Em Tratamento	Sim		Não	
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		Não
Em Tratamento		Sim		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
Familia 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: Periograma

FICHA DE COLETA DE DADOS		Data da Coleta		Examinador		No		Nasc.		Idade																			
Nome Paciente																													
DENTE	IPV			ISG			DISTO VESTIBULAR			VESTIBULAR			MESIO VESTIBULAR			MESIO LINGUAL			LINGUAL			DISTO LINGUAL			Furca	FR	GM		
	D	V	P	D	V	P	PS	Inf	NIC	IR-H	PS	Inf	NIC	IR-H	PS	Inf	NIC	IR-H	PS	Inf	NIC	IR-H	PS	Inf				NIC	IR-H
18																													
17																													
16																													
15																													
14																													
13																													
12																													
11																													
21																													
22																													
23																													
24																													
25																													
26																													
27																													
28																													
38																													
37																													
36																													
35																													
34																													
33																													
32																													
31																													
41																													
42																													
43																													
44																													
45																													
46																													
47																													
48																													

ANEXO 1

PROJETO DE PESQUISA

Título: Avaliação da expressão e produção de proteínas de choque térmico autólogas em portadores de periodontite estimuladas por antígenos de *Porphyromonas gingivalis*

Área Temática:

Pesquisador: Soraya Castro Trindade

Versão: 1

Instituição: Universidade Estadual de Feira de Santana

CAAE: 00826812.6.0000.0053

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 79791

Data da Relatoria: 31/08/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto multidisciplinar de cooperação interinstitucional UEFS/UFBA tendo como campo de trabalho a Clínica Odontológica da Cooperfeira onde estagiam os estudantes de Odontologia da UEFS na disciplina Diagnóstico Oral I. Na introdução os autores registram que a doença periodontal compreende um grupo de infecções envolvendo os tecidos de proteção e sustentação dos dentes. Variando de um processo inflamatório gengival reversível a destruição crônica dos tecidos de sustentação periodontais, podendo levar a perda dentária. Ressaltam a relação entre gengivite e periodontite com microrganismos, a influência de fatores sócio-econômicos, gênero (mais freqüente em homens), etnia, idade avançada tendo como fatores de risco o hábito de fumar e o diabetes. Diante da severidade da doença e dos prejuízos Por ela acarretados os autores colocam como problema: Existe associação entre a expressão e produção de proteínas de choque térmico autólogas por antígenos de *Porphyromonas gingivalis*, em indivíduos portadores de periodontite? Chegando à Hipótese: A expressão e produção da proteína de choque térmico autóloga em portadores de periodontite podem ser estimuladas por antígenos do *Porphyromonas gingivalis* assim como por sua proteína de membrana HmuY. Os Autores trazem farta literatura atualizada embasando o referencial teórico. O currículo dos pesquisadores mostra relação com o tema em estudo. E ambas as instituições envolvidas possuem as condições de suporte necessárias para garantir a execução do trabalho.

Objetivo da Pesquisa:

Geral - Avaliar a expressão e produção de proteínas de choque térmico autólogas em CMSP de pacientes portadores de periodontite crônica e agressiva sob estímulos antigênicos de *Porphyromonas gingivalis*.
Específicos - Comparar a expressão e produção de proteínas de choque térmico autólogas em CMSP de indivíduos com e sem periodontite, estimuladas com antígenos somáticos de *Porphyromonas gingivalis*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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.

Benefícios:

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.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

metodologia extensa, bem delineada, compreenderá 03 grupos: experimental 1 com 50 pessoas com periodontite crônica; experimental 2 com 20 pessoas com periodontite agressiva e 50 pessoas no grupo controle. Parâmetros a serem considerados: avaliação da condição periodontal (com os descritores clínicos); diagnóstico da doença periodontal; atividades de laboratório com preparação de antígenos; coleta de sangue com sem informar onde acontecerá e quem fará; cultivo celular, ensaio imunoenzimático

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

a) Estrutura do protocolo: protocolo completo conforme Res. 196/96 e normas do CEP-UEFS. Na Metodologia (pág. 32) informa que haverá coleta de sangue (30 mL) porém não informa onde e quem fará a coleta com apenas diz que será por uma pessoa treinada. O Apêndice 1 com Ficha de anamnese e Apêndice 3, trazem campo para nome. É conveniente usar nº ou pseudônimo. Cronograma não prevê submissão ao CEP nem envio de relatórios (parcial e final); também não prevê retorno social para os sujeitos.

Recomendações:

TCLE

- a) rever a palavra com gratuitamente;
- b) inserir o nome da Pesquisadora Responsável com quem assina a Folha de Rosto;
- c) inserir endereço institucional completo da Pesquisadora Responsável para esclarecimentos;
- d) retirar endereço do CEP para esclarecimentos;
- e) dizer, apenas, que o sujeito pode se retirar a qualquer momento sem prejuízo ao seu atendimento

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FEIRA DE SANTANA, 22 de Agosto de 2012

Assinado por:

Maria Angela Alves do Nascimento